

Humboldt-Universität zu Berlin



DISSERTATION IM FACH BIOPHYSIK

Charakterisierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle an glialen Vorläuferzellen der Maus

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Institut für Biologie

Dipl.-Biophys. Kathrin Schmidt
geb. am 12.02.1970 in Berlin

Dekanin der Fakultät
Prof. Dr. V. Bonacic-Koutecky

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Kettenmann
 2. Prof. Dr. R. Veh
 3. Priv. Doz. Dr. I. Bernhardt

eingereicht: 30.03.1998
Datum der Promotion: 16.10.1998

Zusammenfassung

Das Membranstrommuster von Oligodendrozyten verändert sich während der Entwicklung dieser Zellen sehr stark. Während die Membranleitfähigkeit von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen von auswärts rektifizierenden Kaliumkanälen geprägt ist, exprimieren reife Oligodendrozyten passive, nicht spannungsabhängige Kaliumkanäle. Die Aktivität dieser Kanäle beeinflusst die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von spannungsaktivierbaren Kaliumkanälen des Kv1-Typs (*Shaker*-Typ) in kultivierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen anhand der Transkriptexpression, der Expression von Kv1-Proteinen und der elektrophysiologischen und pharmakologischen Analyse der Membranströme untersucht.

Auf mRNA Ebene wurden unterschiedliche Kombinationen von Kv1.1, Kv1.4; Kv1.5 und Kv1.6 Transkripten gefunden. Ebenfalls wurde in einigen Zellen eine signifikante Menge an Kv1.2 und Kv1.3 Transkripten gefunden. Die Heterogenität der Transkriptexpression konnte nicht mit Unterschieden in den elektrophysiologischen Eigenschaften korreliert werden.

Die Expression der Kv1 Proteine wurde mit Hilfe von immunozytochemischen Färbungen mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen die Kanäle Kv1.1 bis Kv1.6 untersucht. Alle Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimierten die Kanäle Kv1.4 (85% der Zellen), Kv1.5 (99 %) und Kv1.6 (99 %), Kv1.1 Proteine wurden von 10 % der Zellen gebildet.

Um den funktionellen Beitrag der Kv1 Kanäle zum Gesamtzellstrom zu bestimmen, wurde die Stromaktivierung und -inaktivierung sowie die Sensitivität der Ströme gegen die spezifischen Kaliumkanalblocker getestet. Dabei wurden durch TEA (1-100 mM), 4-AP (0,125-1 mM) und Chinidin (5-100 μ M) jeweils ein großer Teil der Ströme gehemmt, durch CTX, DTX und MCDP wurde die Kanalaktivität nicht beeinflusst.

Um den Beitrag der Kanalproteine Kv1.4 bzw. Kv1.1 zu den elektrophysiologischen Eigenschaften des Gesamtzellstromes zu testen, wurden an einzelnen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen kombinierte elektrophysiologische Untersuchungen und immunozytochemische Färbungen durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kv1.4/Kv1.4 positiven und Kv1.1/Kv1.4 negativen Zellen festgestellt werden.

Aus den Untersuchungen ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

1. Oligodendrozyten exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Kv1 Transkripte.
2. Die überwiegende Mehrzahl der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimieren die Kv1 Proteine Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6.
3. Der Gesamtzellstrom kann vorwiegend durch Kv1.5 Kanäle oder durch eine Kombination von Kv1.4/Kv1.6 Kanälen sowie durch Mitglieder anderer Familien spannungsabhängiger Kaliumkanäle getragen werden.

Um zu untersuchen, ob spannungsabhängige Kaliumkanäle durch die Aktivierung von inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren beeinflusst werden, wurden kultivierte Körnerzellen als Modellsystem verwendet, da diese eine hohe Dichte an Kv Kanälen sowie an GABA Rezeptoren exprimieren. Im "cell-attached" Modus der Patch-Clamp-Technik wurde die Reaktion von einzelnen auswärts rektifizierenden Kaliumkanälen während der GABA-Antwort untersucht. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, daß die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle während der Reaktion der Zelle auf GABA stark zurückgeht. Da Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ebenfalls GABA_A-Rezeptoren exprimieren, ist anzunehmen, daß deren Aktivierung über einen analogen Mechanismus zur Blockierung von Kaliumkanälen führt.

Schlagwörter

Oligodendrozyten, Kaliumkanal, Elektrophysiologie, Immunozytochemie

Abstract

The membrane current pattern of oligodendrocytes changes dramatically during cell development. In oligodendrocyte precursor cells the membrane conductance is dominated by outwardly rectifying potassium channels, mature oligodendrocytes on the other hand express passive, not voltage-gated potassium channels. The activity of these channels influences the proliferation and differentiation of the cells.

In the present work the expression of outwardly-rectifying potassium channels of the Kv1-type (Shaker-type) was analysed in oligodendrocyte precursor cells in culture. Expression of Kv1 transcripts, Kv1 proteins as well as electrophysiological and pharmacological properties of these channels were tested.

Different combinations of Kv1.1, Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.6 transcripts were detected at mRNA level. In some cells also a significant amount of Kv1.2 and Kv1.3 transcripts was found. The heterogeneity of transcript expression could not be correlated with differences in electrophysiological properties.

The expression of Kv1 channel proteins was analysed using immunocytochemical stainings with specific monoclonal antibodies against the channel molecules Kv1.1 to Kv1.6. All oligodendrocyte precursor cells expressed the channel molecules Kv1.4 (85 % of the cells), Kv1.5 (99 %) and Kv1.6 (99 %), Kv1.1 proteins were detected in 10 % of the cells.

To find out the functional contribution of Kv1 channels to the whole-cell current of the cells the activation and inactivation characteristics as well as the sensitivity of the potassium current to different potassium channel specific antagonists was tested. Parts of the current were inhibited by TEA (1-100 mM), 4-AP (0,125-1 mM) and Chinidin (5-100 μ M), CTX, DTX and MCDP had no effect on the channel activity.

To isolate the contribution of the channel molecules Kv1.1 and Kv1.4 the electrophysiological properties of the whole cell current electrophysiological analysis of single cells using whole-cell patch-clamp technique and immunocytochemical stainings were combined. With this method no significant differences between Kv1.1/Kv1.4-positive and Kv1.1/Kv1.4 negative cells could be detected.

From these findings the following conclusions could be drawn:

Oligodendrocyte precursors express various different Kv1 transcripts.

The majority of oligodendrocyte precursor cells expresses the Kv1 proteins Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.6.

The total current (whole-cell current) most likely is carried through Kv1.5 channels or a combination of Kv1.4/Kv1.6 channels and probably another type of voltage-gated potassium channels.

To find out if voltage-gated potassium channels are related to the activation of inhibitory neurotransmitter receptors a model system of cultured granule cells was used. This cell type was selected because they are known to express a high density of Kv channels as well as GABA_A receptors as well. The activity of single outwardly rectifying potassium channels was detected using the cell-attached mode of patch-clamp technique. With this method it could be

demonstrated that the open probability of voltage-gated potassium channels is markedly decreased during GABA_A response.

It could be concluded that the activation of GABA_A receptors on oligodendrocyte precursor cells leads to the inhibition of potassium channels in the same way as in cultured granule cells.

Keywords:

oligodendrocytes, potassium channel, electrophysiology, immunocytochemistry

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Oligodendrozyten sind die myelin-bildenden Zellen im ZNS.....	3
1.2 Oligodendrozyten entwickeln sich aus proliferierenden Vorläuferzellen in den subventrikulären Zonen	4
1.3 Die Entwicklung der Oligodendrozyten ist durch die Expression spezifischer Antigene gekennzeichnet.....	5
1.4 Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimieren spannungsgesteuerte Ionenkanäle	6
1.5 Spannungsabhängige K ⁺ Ströme.....	7
1.6 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle sind heteromere Transmembranproteinkomplexe	7
1.7 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle kodieren für eine Vielzahl unterschiedlicher Kaliumströme	8
1.8 Spannungsabhängige Kaliumkanäle regulieren wichtige Zellfunktionen.....	11
1.9 Gliale Neurotransmitterrezeptoren können Neuron/Glia-Interaktionen vermitteln.....	11
1.10 Kaliumkanäle werden durch die Aktivierung von Glutamatrezeptoren beeinflusst.....	12
1.11 Expression von inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren (GABA-Rezeptoren) in Oligodendrozyten/Oligodendrozytenvorläuferzellen.....	12
2 Zielstellung.....	14
3 Methoden.....	15
3.1 Zellkultur	15
3.1.1 Präparation der Oligodendrozytenkulturen	15
3.1.2 Präparation der Körnerzellkulturen	15
3.1.3 Medien.....	15
3.2 Elektrophysiologie	17
3.2.1 Methodik.....	17
3.2.2 Patch-Clamp Elektroden	18
3.2.3 Messplatz	18
3.2.4 Spannungssprungprotokolle	19
3.2.5 Lösungen	20
3.2.6 Pharmakologie	21
3.3 Immunzytochemische Analyse der Kaliumkanäle und oligodendrozytenspezifischen Marker	21
3.4 Einzelzell-PCR	23
4 Ergebnisse	25
4.1 Shaker-Kaliumkanäle auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	25
4.1.1 Charakterisierung der Zellkultur	25
4.1.2 Eigenschaften der Auswärtsströme	27
4.1.3 Pharmakologie der K ⁺ -Auswärtsströme	30
4.1.4 Expression von Kv1 Proteinen.....	38
4.1.5 Expression von Kv1 Transkripten	42
4.1.6 Einfluß der Kv1.1 bzw. Kv1.4-Expression auf die elektrophysiologischen Eigenschaften	46

4.2	Rolle von Kaliumkanälen bei der Neurotransmitterantwort	49
4.2.1	Hemmung von auswärts rektifizierenden K^+ Kanälen durch GABA.....	49
4.2.2	GABA blockiert die K^+ Einzelkanalaktivität.....	54
5	Diskussion	58
5.1	Oligodendrozyten verfügen über ein heterogenes Repertoire von Kaliumkanälen	58
5.2	Expression von Kv1 Kaliumkanalproteinen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.....	58
5.3	Beitrag der Kv1 Kanäle zum Gesamtstrom.....	59
5.4	Einfluß der Kv1.1 bzw. Kv1.4 Expression auf die elektrophysiologischen Eigenschaften	59
5.5	Expression von weiteren spannungsregulierten K^+ Kanälen	60
5.6	Pharmakologie der homomeren Kv1 Kanäle.....	60
5.7	Bildung von heteromeren Kv1 Kanälen.....	62
5.8	Bindung von β -Untereinheiten.....	62
5.9	Posttranslationale Regulationsmechanismen.....	63
5.10	Subzelluläre Verteilung von Kv1 Kanälen.....	63
5.11	Expression von diversen Kv1 Transkript-Kombinationen.....	64
5.12	Shaker- Kaliumkanal-Transkripte und -proteine werden auf unterschiedliche Weise reguliert.....	64
5.13	Funktionelle Rolle von Kv1 Kanälen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.....	65
5.14	Spannungsaktivierte K^+ Kanäle werden durch die Aktivierung des GABA _A -Rezeptors geblockt	66
5.15	Die Blockade von K^+ Kanälen verstärkt die Depolarisation.....	66
6	Zusammenfassung	67
	<i>Literatur</i>	68
	<i>Anhang</i>	79
	Abbildungsverzeichnis.....	79
	Tabellenverzeichnis	80
	<i>Danksagung</i>	81
	<i>Lebenslauf</i>	82
	<i>Erklärung</i>	83

Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat
BME	Basalmedium nach Eagle
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
BSA	Rinderserumalbumin
CTX	Charybdotoxin
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	Diazabicyclo-[2.2.2]-Octan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dioxion
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DTX	Dendrotoxin
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
GABA	γ -Aminobuttersäure
HBSS	physiologische Salzlösung nach Hank
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
Lf	Leitfähigkeit
MCDP	mast cell degranulating peptide
NGS	Normales Ziegenserum
NMDAN	Methyl-D-Aspartat
NMRI	Naval Medical Research Institute (Mäusestamm)
O-2A	Oligodendrozyt-Typ2 Astrozyt
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
Pll	Poly-L-Lysin
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TIT	3,3',5-Triiodo-L-Thyronin
TTX	Tetrodotoxin
U	internationale Enzymeinheit
V_m	Membranpotential
V_p	Vorpulspotential
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Oligodendrozyten sind die myelin-bildenden Zellen im ZNS

Das Zentralnervensystem von höheren Wirbeltieren lässt sich morphologisch in Bereiche von grauer und weißer Substanz einteilen. Die weiße Substanz besteht aus Nervenfasern (Axonen) und Gliazellen (Oligodendrozyten und Astrozyten). Die charakteristische weiße Farbe rührt von dem hohen Anteil an Myelin (50-60 % des Trockengewichts), der fettreichen Hüllsubstanz der Axone her. Auf einem myelinisierten Axon wechseln sich lange, myelinisierte Abschnitte mit kurzen myelinfreien Stücken, den Ranvierschen Schnürringen ab. Da die Myelinisierung eine elektrische Isolierung der Zellmembran bewirkt, ist die Erregbarkeit der Nervenzellmembran von myelinisierten Axonen auf die Ranvierschen Schnürringe beschränkt. Zusätzlich ist die Dichte an spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanälen in diesen myelinfreien Bereichen der Axonmembran stark erhöht (Waxman und Ritchie, 1985, Waxman und Ritchie, 1993). Aus diesen Gründen erfolgt die Weiterleitung von Aktionspotentialen bei myelinisierten Fasern diskontinuierlich von Schnürring zu Schnürring, was zu einer enormen Erhöhung der Nervenleitgeschwindigkeit und zur Energieeinsparung führt.

In nichtmyelinisierten Nervenfasern hingegen sind die Natrium- und Kaliumkanäle gleichmäßig auf der Membran verteilt und die Aktionspotentiale werden kontinuierlich und langsamer fortgeleitet.

Erkrankungen, die eine Störung des Myelins bewirken, haben deshalb immer ernsthafte Störungen der Nervenleitung zur Folge. Bei der Multiplen Sklerose (MS) werden die myelinbildenden Zellen durch das Immunsystem angegriffen (Storch und Lassmann, 1997) und zerstört. Dadurch wird die Weiterleitung von Nervenimpulsen im Gehirn massiv gestört (bzw. verlangsamt) und es kommt deshalb zu gravierenden Beeinträchtigungen der Patienten wie Lähmungen, Seh-, Sprach- oder Bewegungsstörungen.

Die myelin-bildenden Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind die Oligodendrozyten. Ihre Proliferation wird durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren reguliert. Kommen diese Zellen mit einem nicht myelinisierten Axon in Kontakt, so beginnen sie als Reaktion auf ein axonales Mitogen zu proliferieren. Es wurden verschiedene axonale Mitogene beschrieben, die auf das Oligodendrozyten- bzw. Schwannzellwachstum wirken können (DeVries et al., 1983, Chen und DeVries, 1989), z.B. die Proteinfamilie der Hereguline (HRGs) (Morrissey et al., 1995) oder andere Wachstumsfaktoren wie bFGF (basic fibroblast growth factor) oder PDGF (platelet derived growth factor) (Stewart et al., 1991).

Zur Bildung der Myelinscheide wachsen lange, zungenartige Membranfortsätze dieser Zellen spiralförmig mehrfach eng um ein Axon. Dabei wird das Zytoplasma in diesem Bereich fast vollständig reduziert, so daß um das Axon ein zylinderförmiger, eng gepackter Membranstapel, das reife Myelin, entsteht (Morell et al., 1990; Hildebrand et al., 1993; Hildebrand et al., 1994). Oligodendrozyten können täglich bis zum Dreifachen ihrer Zellmasse an Myelin produzieren. Während die myelinbildenden Zellen des peripheren Nervensystems, die Schwannzellen, nur ein Axon umhüllen, können die Oligodendrozyten des ZNS 5 bis 50 Axonsegmente verschiedener Axone mit ihren Membranfortsätzen umhüllen (Butt und Ranson, 1989; Bjartmar et al., 1994).

Die Membranzusammensetzung des Myelins unterscheidet sich stark von der Ursprungszelle. Im Myelin ist mit 70 % des Trockengewichts der Lipidgehalt viel höher als auf dem Zellkörper des Oligodendrozyten (40 %) (Ludwin, 1997). Die Proteinkomponenten im Myelin dienen hauptsächlich zur Aufrechterhaltung der Myelinstruktur.

Ein wichtiges myelinspezifisches Membranprotein ist das Proteolipid Protein (PLP). Es bewirkt die gegenseitige Verankerung der gestapelten Myelinschichten (Griffiths et al., 1995). Das basische Myelinprotein (myelin basic protein - MBP) macht 35 % des Myelinproteins aus (Hildebrand et al., 1993). Es wird auf der zytoplasmatischen Seite der Membran exprimiert und bewirkt durch die Verankerung der gegenüberliegenden Membranseiten jeweils eines Ausläufers die Kompaktierung des Myelins (Deber und Reynolds, 1991). Obwohl die Myelinproteine nur in relativ kleinen Mengen vorkommen, kann ihre Abwesenheit zu schweren Myelinisierungsstörungen führen. Das Charcot-Marie-Tooth-Syndrom ist eine Erbkrankheit des Menschen, bei der aufgrund von Störungen bei der Ausbildung der Myelinschicht die Nervenleitgeschwindigkeit stark herabgesetzt ist. Die Patienten leiden unter anderem unter Seh-, Sprach- und Bewegungsstörungen. Genetische Analysen haben gezeigt, daß eine Mutation des Hauptproteins des peripheren Myelins, des PMP22-Proteins die Ursache für die Erkrankung ist (LeGuern et al., 1997; Warner et al., 1996). Das Pelizaeus-

Merzbacher-Syndrom ist eine Erbkrankheit, die durch eine Veränderung des PLP-Genes verursacht wird (Inoue et al., 1996). Auch diese Krankheit ist mit schweren Beeinträchtigungen wie spastischen Lähmungen, Bewegungsstörungen sowie stark herabgesetzter Intelligenz verbunden, die durch den Schwund der Markscheiden vor allem in den Großhirnhemisphären hervorgerufen werden.

Die Auswirkungen von Mutationen dieser Myelinproteine auf den Aufbau der Myelinstruktur werden in Tierexperimenten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß sowohl die Mutation des PLP-Genes bei Mäusen des "jimpy-" Genotyps (Schneider et al., 1995) als auch die Mutation des MBP-Genes bei Mäusen des "shiverer-" Typs (Roach et al., 1985) eine starke Störung der Myelinbildung bewirken (Rosenbluth, 1980).



Abbildung 1
Oligodendrozyten bilden die Myelinscheide von Axonen

Oligodendrozyten besitzen zahlreiche flache Ausläufer, die beim Kontakt mit einem unmyelinisierten Axonbereich dieses fest umwickeln. Zwischen den myelinisierten Abschnitten bleiben kurze Abschnitte der Axonmembran frei und somit fähig zur Weiterleitung von Aktionspotentialen. Dabei kann ein Oligodendrozyt bis zu 50 Axone myelinisieren.

1.2 Oligodendrozyten entwickeln sich aus proliferierenden Vorläuferzellen in den subventrikulären Zonen

Zur Ausbildung der komplexen Struktur des Nervensystems müssen die Stammzellen zur richtigen Zeit und am richtigen Ort ihren entsprechenden Differenzierungsweg durchlaufen. Die Informationen hierzu können der Zelle vererbt werden oder durch Faktoren aus ihrem lokalen Umfeld vermittelt werden. Während die ontogenetische Entwicklung von weniger hoch entwickelten Organismen weitgehend autonom reguliert wird, steht bei Vertebratenembryonen die direkte Beeinflussung des Entwicklungsweges durch lokale Wechselwirkungen zwischen Zellen im Vordergrund.

Der Ursprung aller Neuronen und Gliazellen des Zentralnervensystems sind Stammzellen, die in der frühen Embryonalentwicklung die zerebralen Ventrikel des Neuroepithels, den Spinalkanal sowie den optischen Kanal auskleiden (Levison und Goldman, 1993; Cameron-Curry und Le-Douarin, 1995; Miller, 1996). Oligodendrozyten entstehen aus proliferierenden Vorläuferzellen, die während der frühen Embryonalentwicklung aus den Keimzonen um die Ventrikel in die spätere weiße Substanz einwandern (Gansmüller et al., 1991; Warf et al., 1991; Yu et al., 1994). Über die Faktoren, die diese Zellbewegung steuern, ist noch nicht viel bekannt. Es wird vermutet, daß Zelladhäsionsmoleküle (Ludwin, 1997) und lokale Gradienten von Wachstumsfaktoren (McMorris und McKinnon, 1996) dabei eine große Rolle spielen. Um diese Mechanismen besser verstehen zu können, wurden die Eigenschaften und die Entwicklung der Oligodendrozyten *in vitro* untersucht (Hardy und Reynolds, 1991; Noble und Wolswijk, 1992; Raff et al., 1983; Cameron und Rakic, 1991; Cameron und Rakic, 1991). Oligodendrozyten-Vorläuferzellen teilen sich auch in Zellkultur bei Zugabe von Wachstumsfaktoren wie PDGF und bFGF (Noble et al., 1990) oder Astrozyten-konditioniertem Medium (Raff et al., 1988).

Für Vorläuferzellen aus verschiedenen Hirnregionen konnte gezeigt werden, daß sich diese in Kultur in serumfreiem Medium zu Oligodendrozyten oder bei Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS) zu Typ2-Astrozyten entwickeln (Raff et al., 1983). Bisher konnte jedoch nur in einer Untersuchung gezeigt werden, daß diese Vorläuferzellen sich auch *in vivo* zu Typ2-Astrozyten entwickeln können (Levison und Goldman, 1993).

1.3 Die Entwicklung der Oligodendrozyten ist durch die Expression spezifischer Antigene gekennzeichnet

Die Entwicklung der Oligodendrozytenvorläuferzellen zu reifen Oligodendrozyten ist durch die Expression verschiedener Zelloberflächenantigene und die Reaktion auf verschiedene Wachstumsfaktoren gekennzeichnet. Das früheste experimentell untersuchte Stadium der Oligodendrozytenentwicklung ist durch die Expression der Zelloberflächenantigene (Ganglioside) gekennzeichnet, die durch den monoklonalen Antikörper A2B5 (Eisenbarth et al., 1979) erkannt werden. Diese frühen Vorläuferzellen proliferieren in Reaktion auf eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie PDGF und bFGF (Noble et al., 1988) und sind zur Wanderung fähig (Small et al., 1987). bFGF verhindert zusätzlich die Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen und bewirkt eine erhöhte Synthese von PDGF-Rezeptoren (McKinnon und Yellen, 1990).

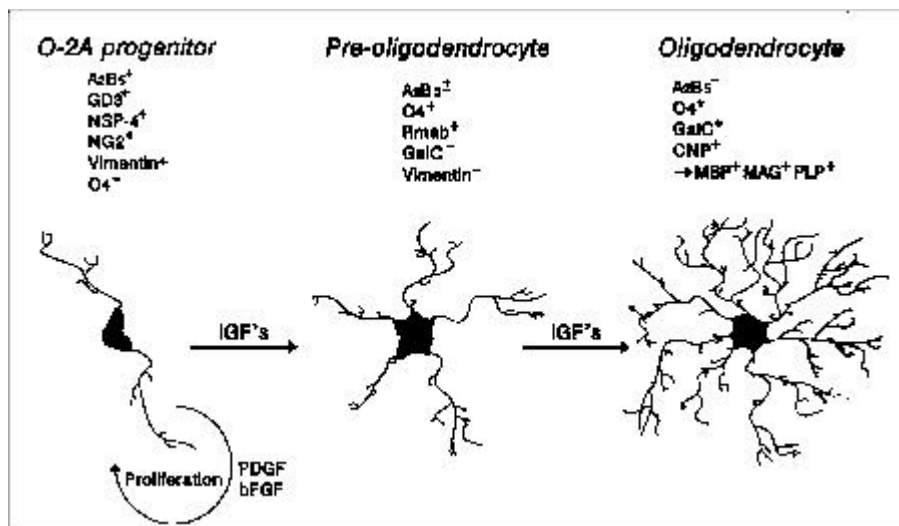


Abbildung 2
Schema der Oligodendrozytenentwicklung

Die Entwicklung von Oligodendrozyten aus dem optischen Nerv der Ratte aus ihren Vorläuferzellen *in vitro* ist durch die Expression spezieller Antigene gekennzeichnet.

Während der weiteren Entwicklung verlieren die frühen Vorläuferzellen ihre migratorische Aktivität sowie die A2B5-Antigene und exprimieren Antigene (Sulfatid, Seminolipid), die durch den monoklonalen Antikörper O4 (Sommer und Schachner, 1981) erkannt werden sowie das Gangliosid GD3 (Goldmann et al., 1984; Curtis et al., 1988) und werden dann als späte Vorläuferzellen bezeichnet. Diese Zellen entwickeln eine komplexere Morphologie mit mehreren Ausläufern und reagieren nicht mehr auf den Wachstumsfaktor PDGF (Fok und Miller, 1994), proliferieren z.T. jedoch noch nach Stimulation mit bFGF.

Das folgende Entwicklungsstadium der sich normalerweise nicht mehr teilenden frühen Oligodendrozyten ist durch eine zusätzliche Expression von O1-Antigenen, (Sommer und Schachner, 1981) (Galaktocerebrosid, Monogalaktosyl-diglyzerid, Psychosin), (Raff et al., 1978; Ranscht et al., 1982; Bansal et al., 1989) gekennzeichnet. Bei den reifen, myelinbildenden Oligodendrozyten kommt dazu noch eine Expression des O10-Antigens, des Proteolipid-Proteins (Kuhlmann et al., 1988, Jung et al., 1996) und von weiteren Myelinproteinen wie 2'3'zyklische-Nukleotid-3'-Phosphohydrolase (CNP), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), basisches Myelinprotein und Myelin/Oligodendrozytenprotein.

Man nimmt an, daß die Differenzierung der Oligodendrozyten *in vivo* mit einem ähnlichen Zeitverlauf vonstatten geht (Temple und Raff, 1986).

Die Oligodendrozytenbildung muß auch in vivo relativ stark reguliert werden. Im optischen Nerv der Ratte sterben ca. 50 % der Oligodendrozyten durch programmierten Zelltod (Apoptose) aufgrund der limitierten Menge an Wachstumsfaktoren (Barres et al., 1992). Während der weiteren Differenzierung der Zellen scheint die elektrische Aktivität von Axonen eine für das Überleben der Oligodendrozyten und die Myelinbildung wichtige Bedingung zu sein (Barres und Raff, 1993). Oligodendrozyten, die in diesem Stadium nicht innerhalb weniger Tage ein unmyelinisiertes Axon erreicht haben, sterben durch Apoptose (Raff et al., 1993). Auf diese Weise wird eine optimale Dichte an Myelin erreicht.

1.4 Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimieren spannungsgesteuerte Ionenkanäle

Lange Zeit galten Gliazellen aufgrund ihres negativen Membranpotentials und ihrer hohen Kaliumleitfähigkeit als elektrisch passiv. In der letzten Zeit wurden jedoch auch bei Gliazellen spannungs- und ligandengesteuerte Ionenkanäle gefunden (Übersicht s. Barres et al., 1990c, Sontheimer, 1994). Das Expressionsmuster der Kaliumströme ist bei Gliazellen spezifisch für ihr Entwicklungsstadium (Sontheimer et al., 1989). Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimieren vorwiegend auswärts rektifizierende Kaliumströme ("delayed rectifier" und z.T. "A-Typ-" Ströme), zu einem geringen Anteil auch spannungsabhängige Kalzium- und Natriumkanäle sowie GABA- und Glutamatrezeptoren (Barres et al., 1990a, von Blankenfeld und Kettenmann, 1991, Patneau et al., 1994). Im Gegensatz dazu besitzen reife Oligodendrozyten eine passive und/ oder einwärts rektifizierende Kaliumleitfähigkeit.

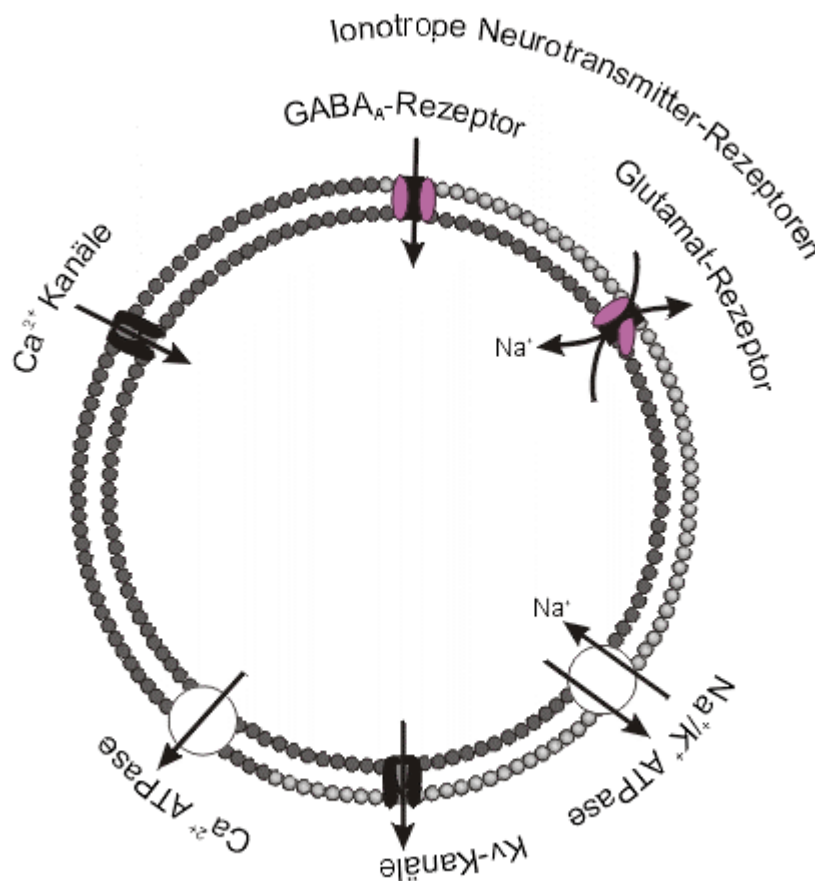


Abbildung 3

Am Ionen-transport von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen beteiligte Membranproteine

Oligodendrozyten-Vorläuferzellen verfügen im Gegensatz zu reifen Oligodendrozyten über spannungsaktivierte, auswärts rektifizierende K^+ Kanäle, sowie über ionotrope $GABA_A$ und Glutamatrezeptoren. Der Kaliumgradient über der Zellmembran wird durch die Na^+/K^+ ATPase aufrechterhalten.

1.5 Spannungsabhängige K⁺ Ströme

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) werden durch Membrandepolarisation aktiviert (Hille, 1992). Während sowohl beim Ruhemembranpotential als auch bei hyperpolarisierenden Potentialen kein Strom durch diese Kanäle fließt, werden die Kv-Kanäle mit steigender Depolarisierung (Aktivierungsschwelle um -40 mV) aktiviert. Zusätzlich tritt aber eine spannungsabhängige Inaktivierung der einmal geöffneten Kanäle statt, die zur Folge hat, daß bei stark depolarisierenden Potentialen die Leitfähigkeit der Kv-Kanäle wieder abnimmt.

Historisch gesehen unterscheidet man zwei Typen spannungsabhängiger Kaliumströme. Die "delayed rectifier" aktivieren mit einer zeitlichen Verzögerung ("delay") und inaktivieren langsam (Zeitkonstanten > 100 ms). Die "A-Typ-" Ströme dagegen inaktivieren sehr schnell mit Zeitkonstanten < 100 ms (Connor und Stevens, 1971a; Connor und Stevens, 1971b) und werden erst durch Hyperpolarisation erneut aktiviert.

1.6 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle sind heteromere Transmembranproteinkomplexe

Ein funktioneller Kanal besteht bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen aus vier α -Untereinheiten, die die Kanalpore bilden (s. Abb. 4) (Liman et al., 1992). Zusätzlich können an der zytoplasmatischen Seite vier β -Untereinheiten gebunden sein (s. Abb. 4A).

Jede α -Untereinheit enthält sechs hydrophobe Transmembrandomänen (S1-S6). Die C- und N-terminalen Enden jeder Untereinheit befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite (s. Abb. 4B). Die eigentliche Porenstruktur wird durch die Region gebildet, die die Segmente S5 und S6 verbindet (H5 oder P-Region). Ebenfalls am Aufbau der Pore beteiligt sind die Struktur zwischen dem S4 und S5-Segment und das carboxyterminale Ende des S6-Segments. Man nimmt an, daß die S4-Domäne eine Komponente des Spannungssensors darstellt, denn sie enthält an jeder dritten Stelle eine basische Aminosäure (Lysin oder Arginin), die eine positive Nettoladung trägt (Papazian et al., 1991) (Übersicht s. Catterall, 1988; Chandy und Gutman, 1995; Pongs, 1992).

Für die Inaktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen sind zwei verschiedene Mechanismen bekannt, die durch unterschiedliche strukturelle Elemente des Kanalproteins bewirkt werden (Hoshi et al., 1990; Hoshi et al., 1991). Die schnelle Inaktivierung (sog. N-Typ-Inaktivierung) wird durch eine Region nahe dem N-Terminus des Proteins, den Inaktivierungspartikel, bewirkt. Eine andere, langsamere Inaktivierung wird durch Strukturen am C-Terminus des Proteins bewirkt (C-Typ-Inaktivierung).

Spannungsabhängige Na⁺ und Ca²⁺ Kanäle haben eine ähnliche molekulare Struktur wie Kv-Kanäle, allerdings existiert dort nur eine porenbildende Untereinheit mit 4x6 Transmembranregionen (s. Catterall, 1988).

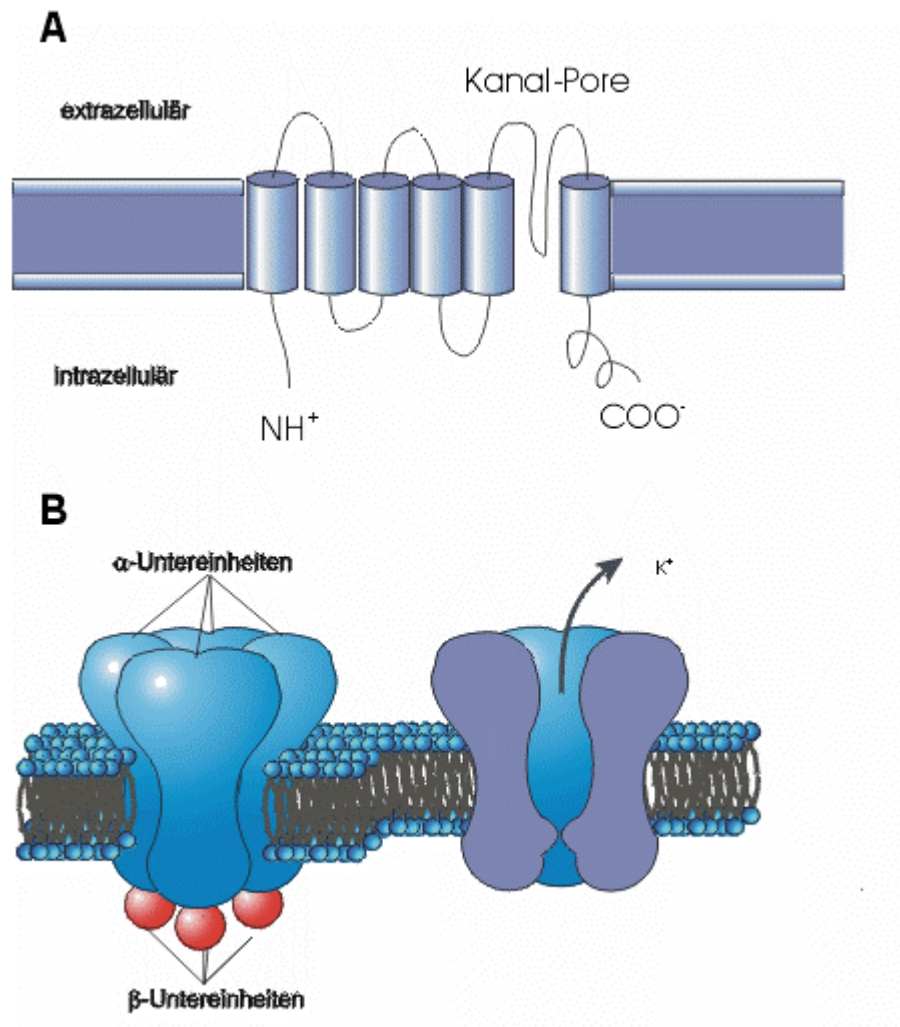


Abbildung 4
Molekularer Aufbau von spannungsabhängigen Kaliumkanälen

- A) Ein spannungsabhängiger Kaliumkanal wird aus 4 transmembranen α-Untereinheiten gebildet, an die auf der zytosomatischen Seite der Membran 4 β-Untereinheiten gebunden sein können.
- B) Eine α-Untereinheit ist ein Protein mit 6 hydrophoben Transmembrandomänen. Die Pore befindet sich zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne, N- und C-Terminus befinden sich auf der zytosomatischen Membranseite.

1.7 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle kodieren für eine Vielzahl unterschiedlicher Kaliumströme

In den letzten Jahren wurden mit elektrophysiologischen und pharmakologischen Methoden eine Vielzahl unterschiedlicher Kaliumströme beschrieben. Diese große Heterogenität ist zum einen durch eine hohe Anzahl unterschiedlicher K⁺ Kanalgene sowie zum anderen durch eine Vielzahl von Regulationsmechanismen begründet.

Die Zahl der K⁺ Kanalgene ist nicht nur in Säugern, sondern auch in weniger hoch entwickelten Tieren sehr groß. Das Nervensystem des Nematoden *Caenorhabditis elegans* besteht aus nur 302 Neuronen. Im Rahmen des *C. elegans* Genomprojekts wurde die bis jetzt sequenzierte DNA-Menge (ca. 45 %) auf vorhandene K⁺ Kanalgene getestet (Wei et al., 1996). Dabei wurden insgesamt 38 K⁺ Kanalgene gefunden. Darauf aufbauend wird die Zahl der Kaliumkanalgene im gesamten *C. elegans* Genom auf 50-80 geschätzt.

Insgesamt sind mindestens 21 verschiedene α-Untereinheiten von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bekannt. Diese lassen sich anhand der Sequenzhomologie in 9 Gruppen unterteilen (Kv1 bis Kv9) (Chandy und Gutman, 1995). Die größte Gruppe bildet die Kv1-Familie (oder Shaker-Kanalfamilie) (Tempel et al., 1987, Papazian et al., 1987), die ursprünglich aus der Fruchtfliege

Drosophila melanogaster kloniert wurde (Kamb et al., 1987) mit bislang 6 Kanalmolekülen (Kv1.1-Kv1.6). Alle Kanäle dieser Gruppe werden im Zentralnervensystem mit unterschiedlichem regionalem Verteilungsmuster exprimiert (Veh et al., 1995).

Viele Kaliumkanalmoleküle sind kloniert und in Expressionssystemen funktional exprimiert worden (Timpe et al., 1988, Grissmer et al., 1994). Die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der homomeren Kanäle sind daher schon relativ gut bekannt. Diese Daten lassen sich jedoch in den meisten Fällen nicht mit *in situ* vorkommenden K⁺ Strömen korrelieren.

Dies liegt einerseits daran, daß innerhalb einer Kanalfamilie sowohl homotetramere Kanäle als auch heterotetramere Kanäle mit gemischten Eigenschaften gebildet werden können (Ruppersberg et al., 1990, Sheng et al., 1993). Durch die Assoziation von β -Untereinheiten werden andererseits die elektrophysiologischen Eigenschaften zusätzlich verändert, α/β Kanäle inaktivieren sehr viel schneller (innerhalb weniger ms) als Kanäle ohne assoziierte β -Untereinheiten (Rettig et al., 1994, Heinemann et al., 1996, Nakahira et al., 1996).

<i>Kanalfamilie</i>	<i>Kanalmolekül</i>	<i>Aktivierungs- kinetik</i>	<i>Inaktivierungs- kinetik</i>	<i>Vorkommen</i>
Shaker (Kv1)	Kv1.1	schnell	DR	ZNS
	Kv1.2	schnell	DR	Herz, ZNS
	Kv1.3	schnell	DR	T-u. B-Zellen, ZNS
	Kv1.4	schnell	A-Typ	Herz, ZNS
	Kv1.5	schnell	DR	Herz, ZNS, glatte Muskulatur
	Kv1.6	schnell	DR	ZNS
Shab (Kv2)	Kv2.1	langsam	DR	ZNS, Herz
	Kv2.2	langsam	DR	ZNS
Shaw (Kv3)	Kv3.1	langsam	DR	T-Zellen
	Kv3.2	langsam	DR	ZNS
	Kv3.3	langsam	A-Typ	ZNS
	Kv3.4	langsam	A-Typ	Skelettmusk.ZN S
Shal (Kv4)	Kv4.1	schnell	A-Typ	ZNS
	Kv4.2	schnell	A-Typ	ZNS, Herz
	Kv4.3	schnell	A-Typ	
Kv5	Kv5.1	kein Strom	Modulation von Kv2	
Kv6	Kv6.1	kein Strom	Modulation von Kv2	
Kv7	?	?	?	
Kv8	Kv8.1	kein Strom	Modulation von Kv2/Kv3	ZNS
Kv9	Kv9.1	kein Strom	Modulation von Kv2	ZNS
	Kv9.2	kein Strom	Modulation von Kv2	ZNS

Tabelle 1: Arten von spannungsabhängigen Kaliumkanalmolekülen

Weiterhin sind für spannungsgesteuerte Kaliumkanäle verschiedene Regulationsmechanismen sowohl auf mRNA-Ebene (Expression von unterschiedlich effektiv translatierten mRNAs, Wymore et al., 1996) als auch auf Proteinebene (Phosphorylierung, Levitan, 1994) beschrieben worden.

Die Proteinsequenz der *Shaker* (Kv1) Kanäle ist zwischen den unterschiedlichen Spezies stark konserviert (z.B. Mensch und Rind: mehr als 98 % Identität des Proteins). Dies ist ein Anhaltspunkt dafür, daß diese Kaliumkanäle wichtige Funktionen in der Physiologie der Zellen erfüllen.

1.8 Spannungsabhängige Kaliumkanäle regulieren wichtige Zellfunktionen

Spannungsabhängige Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellfunktion sowohl in erregbaren als auch in nichterregbaren Zellen.

Während ihre Aktivierung in nichterregbaren Zellen vorwiegend eine Stabilisierung des Membranpotentials bewirkt, sind sie in erregbaren Zellen zusätzlich an der Strukturierung des Aktionspotentials beteiligt. Dabei werden durch die Depolarisation der Zellmembran "delayed rectifier-" K^+ Kanäle aktiviert. Diese öffnen mit einer zeitlichen Verzögerung von ungefähr 2 ms und führen durch einen Ausstrom von Kaliumionen zu einer Repolarisation der Membran. (Hille, 1992). Die Expression dieser Kanäle hat somit einen großen Einfluß auf die Länge und Amplitude des Aktionspotentials (Barish, 1986).

Langandauernde Aktionspotentiale (100-1000 ms; Hille, 1992) führen durch die Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Barish, 1991). Der Kalziumeinstrom hat Einfluß auf die Menge des an Synapsen ausgeschütteten Neurotransmitters (Zucker, 1993, Reuter, 1996), dieser wiederum kann die Ausbildung von funktionalen Synapsen beeinflussen (Henderson et al., 1984 für die Ausbildung von Neuron-Myozyten-Kontakten). Außerdem kann durch den intrazellulären Kalziumanstieg die Genexpression beeinflusst werden, und damit z.B. Neuritenwachstum oder neuronale Differenzierungsvorgänge (Jones und Ribera, 1994, Holliday und Spitzer, 1993) gesteuert werden.

Weil die "delayed rectifier-" Kaliumkanäle während der Repolarisation des Aktionspotentials nur langsam inaktivieren, kommt es zu einer leichten Hyperpolarisation der Zellmembran (10-20 mV). Durch diese Hyperpolarisation werden die A-Typ-Ströme aktiviert (halbmaximale Aktivierungsspannung ca. -70 mV, Hille, 1992), die jedoch schnell spannungsabhängig wieder inaktivieren. Auf diese Weise regulieren A-Typ- K^+ -Ströme in Neuronen die Zeitspanne zwischen zwei Aktionspotentialen und somit die "Feuerrate" des Neurons. Diese stellt einen wichtigen Parameter bei der Verschlüsselung der neuronalen Information dar.

In den Pyramidenzellen des Hippocampus z.B. ist die Dichte von "A-Typ" K^+ Kanälen in den Dendriten besonders hoch. Dies verhindert die Initiation von Aktionspotentialen in den Dendriten sowie die Rückwärtsleitung von am Axonhügel ausgelösten Aktionspotentialen (Hoffman et al., 1997).

Während in neuronalen Zellen bereits viel über die physiologische Rolle von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bekannt ist, sind die physiologischen Konsequenzen der Expression dieser Kanäle in nichterregbaren Zellen nur wenig bekannt. U.a. wurde eine Rolle von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bei der Regulation der Zellproliferation (Knutson et al., 1997, Lepple-Wienhues et al., 1996), bei der Volumenregulation (Deutsch und Chen, 1993) und beim programmierten Zelltod (Apoptose) (Yu et al., 1997) beschrieben.

Gallo et al., 1996 zeigten an kultivierten Oligodendrozytenvorläuferzellen, daß die Aktivierung von Glutamaterezeptoren (des AMPA/Kainat-Typs) die Proliferation und Weiterdifferenzierung dieser Zellen hemmt. Dieser Effekt ist durch die Blockierung von "delayed rectifier-" K^+ Kanälen mit Tetraethylammonium (TEA) reproduzierbar. Es wird angenommen, daß der Einstrom von Na^+ über den Rezeptorkanal zu einer Erhöhung der intrazellulären Na^+ Konzentration und somit zu einem Block von auswärts rektifizierenden Kaliumkanälen führt (Borges und Kettenmann, 1995, Knutson et al., 1997).

1.9 Gliale Neurotransmitterrezeptoren können Neuron/Glia-Interaktionen vermitteln

Gliazellen befinden sich im Gehirn in engem Kontakt mit neuronalen Zellkörpern, Axonen und synaptischen Strukturen. Eine Reihe von Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik, Kalzium-Imaging-Techniken sowie mit molekularbiologischen Techniken haben gezeigt, daß nicht nur Neuronen, sondern auch Gliazellen abhängig von Entwicklungsstadium, Zelltyp und der entsprechenden Hirnregion spannungsabhängige Ionenkanäle (Barres et al., 1990a; Barres et al., 1990b; Sontheimer und Waxman, 1993; Sontheimer, 1994) und Neurotransmitterrezeptoren (von Blankenfeld und Kettenmann, 1991; Berger et al., 1992; Patneau et al., 1994; Gallo und Russell, 1995) exprimieren können. Aufgrund der anatomischen Nähe zu neuronalen Elementen sind

Gliazellen, die Rezeptoren für die entsprechenden Neurotransmitter besitzen, in der Lage, neuronale Signale zu empfangen. Astrozyten bilden nach Stimulation mit Glutamat vermehrt Ausläufer. Auf diesem Wege vermutet man eine längerfristige Modulation der synaptischen Verbindungen, wie sie z.B. für das Langzeitgedächtnis notwendig sind (von Blankenfeld und Kettenmann, 1991).

1.10 Kaliumkanäle werden durch die Aktivierung von Glutamatrezeptoren beeinflusst

Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen zeigen rezeptorvermittelte Antworten auf den wichtigsten erregenden Neurotransmitter im ZNS, Glutamat. Diese lassen sich auf unterschiedliche Arten von Rezeptoren zurückführen.

Die Signalweiterleitung von Transmitterrezeptoren kann entweder metabotrop, d.h. durch die Aktivierung von intrazellulären "second-messenger" Kaskaden oder ionotrop durch das Öffnen eines in den Rezeptor integrierten Ionenkanals geschehen. Ionotrope Glutamatrezeptoren besitzen einen relativ wenig selektiven Kationenkanal, der bei Aktivierung des Rezeptors einen vorwiegend von Natriumionen (z.T. auch Kalziumionen) getragenen Einwärtsstrom bewirkt (Schneggenburger et al., 1993, Tempia et al., 1996). Glutamatrezeptoren lassen sich weiterhin aufgrund ihrer Selektivität für die Agonisten NMDA (N-methyl-D-Aspartat), AMPA (Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat) oder Kainat unterscheiden. Am meisten verbreitet sind ionotrope Rezeptoren des non-NMDA-Typs, die durch die Agonisten AMPA und Kainat und den spezifischen Antagonisten DNQX (6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dioxion) charakterisiert sind (s. von Blankenfeld und Kettenmann, 1991). In Zellen der Oligodendrozyten-Linie wurden AMPA/Kainat-Rezeptoren u.a. in Zellkulturen des jungen und adulten optischen Nerven der Ratte (Borges und Kettenmann, 1995), sowie embryonalem Maus-Gehirn (Borges et al., 1994), frisch isolierten Zellen des unreifen optischen Nerven und in Hirnschnitten des corpus callosum der Maus (Berger et al., 1992) gefunden. In kultivierten Rattenoligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen konnten Patneau et al. (Patneau et al., 1994) die mRNAs für die AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 (nur gering), GluR2,3 und 4 sowie die Kainat-Rezeptor-Untereinheiten GluR6,7 und KA1 und KA2 nachweisen.

In einer Vielzahl von Zellen, u.a. kultivierte embryonale (Borges et al., 1994) und adulte Oligodendrozytenvorläuferzellen (Borges und Kettenmann, 1995), Bergmann Gliazellen (Müller et al., 1992) oder Gliazellen des Hippocampus *in situ* (Jabs et al., 1994) führt eine Aktivierung der AMPA/Kainatrezeptoren zu einer Reduktion der Kaliumleitfähigkeit. In Bergmanngliazellen wird dies durch einen Kalziumeinstrom über den AMPA/Kainatrezeptor und anschließenden Block von Kalzium-sensitiven Kaliumkanälen bewirkt (Müller et al., 1992).

In kultivierten Oligodendrozytenvorläuferzellen aus embryonalem Maushirn führt die Aktivierung des AMPA/Kainatrezeptors zu einer Blockade von Kalium-Auswärtsströmen des "delayed-rectifier"-Typs, während die Einwärtsströme nicht beeinflusst werden (Borges et al., 1994). Dieser Effekt wird nicht durch einen Kalziumeinstrom in die Zelle bewirkt, da er in kalziumfreier Lösung nicht reproduziert werden konnte. Es wird vermutet, daß dieser Block durch einen Einstrom von Natrium-Ionen über das Rezeptormolekül vermittelt wird und die erhöhte intrazelluläre Na^+ Konzentration die K^+ Kanäle blockiert (Borges und Kettenmann, 1995).

Derselbe Mechanismus wird von Robert und Magistretti (Robert und Magistretti, 1997) für den AMPA/Kainat-rezeptorvermittelten Block von K^+ Strömen in kultivierten Astrozyten vorgeschlagen.

1.11 Expression von inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren (GABA-Rezeptoren) in Oligodendrozyten/Oligodendrozytenvorläuferzellen

Inhibitorische Neurotransmitter (wie z.B. GABA) führen nach der Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials.

Ionotrope GABA_A -Rezeptoren sind permeabel für Chlorid und werden durch den spezifischen Agonisten Muscimol geöffnet und durch den spezifischen Antagonisten Bicucullin sowie den Chloridkanalblocker Picrotoxin gehemmt (von Blankenfeld und Kettenmann, 1991). Bei Neuronen hingegen wirkt GABA als inhibitorischer Transmitter, da aufgrund der niedrigeren intrazellulären Chloridkonzentration die Rezeptoraktivierung zu einem Einstrom von Cl^- Ionen und damit zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Bei Gliazellen und bei einigen Neuronen (z.B. Körnerzellen) hingegen kommt es zu einem Ausstrom von Cl^- Ionen aus der Zelle und dementsprechend zu einer Depolarisation.

Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimieren ionotrope GABA-Rezeptoren des

GABA_A-Typs (Kettenmann et al., 1991; Berger et al., 1992; Butt und Tutton, 1992).

Sowohl in Bergmann Gliazellen (Müller et al., 1994), kultivierten Körnerzellen (Labrakakis et al., 1997) und in Astrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen in Rückenmarksschnitten von neonatalen Ratten (Pastor et al., 1995) führt die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zu einer Blockierung von Kaliumströmen.

Da Gliazellen somit in der Lage sind, neuronale Signale zu empfangen, ist es anzunehmen, daß Gliazellen auch aktiv an der Signalübertragung im Gehirn teilnehmen.

2 Zielstellung

Während reife Oligodendrozyten ausschließlich passive Kaliumströme besitzen, exprimieren Oligodendrozytenvorläuferzellen spannungsgesteuerte K^+ Ströme.

Es ist bekannt, daß die Aktivität von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen einen Einfluß auf die Proliferation sowie die Differenzierung dieser Zellen hat. Es ist zwar eine Vielzahl von spannungsabhängigen Kaliumkanalgenen bekannt, aber es gibt es noch wenig Daten über die Expression dieser Kanäle in primären Zellen des Nervensystems.

Die größte und am besten untersuchte Gruppe von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen bildet die Kv1-Familie (*Shaker*-Familie). Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Moleküle dieser Familie auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert werden und in welcher Weise diese Kanäle zum Gesamtzellstrom beitragen. Die Untersuchung der Expression dieser Kanäle soll auf mRNA Ebene mit Hilfe der Einzelzell-PCR-Technik sowie auf Proteinebene durch immunozytochemische Färbungen erfolgen.

Mit Einzelzell-PCR-Experimenten soll die Expression von Kv1-Transkripten in kultivierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen getestet werden und mit dem Ganzzellstrommuster der Zellen verglichen werden. Durch die Verwendung von degenerierten Primern kann untersucht werden, ob in einer Zelle mehrere Kv1 Transkripte gleichzeitig exprimiert werden. Um eine Korrelation zwischen Transkriptexpression und Strommuster zu finden, werden die Zellen vor der PCR-Analyse im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik untersucht.

Mit immunozytochemischen Färbungen soll untersucht werden, welche Proteine der Kv1-Familie auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert werden und ob diese Kanäle vorwiegend in spezifischen subzellulären Bereichen exprimiert werden. Durch eine Kombination von Färbungen und Elektrophysiologie bzw. Pharmakologie soll der Anteil der einzelnen identifizierten Kv1 Kanäle zum Gesamtstrom abgeschätzt werden.

Die gemessenen Parameter sollen mit den Daten aus Expressionssystemen verglichen werden.

Es ist bekannt, daß es bei der Aktivierung von exzitatorischen Neurotransmitterrezeptoren vom Kainat-Typ zur Blockierung von auswärts rektifizierenden Kaliumkanälen kommt. Aus diesem Grunde soll untersucht werden, ob auch inhibitorische Neurotransmitterrezeptoren spannungsabhängige Kaliumkanäle beeinflussen können. Für diese Untersuchungen soll die GABA-Antwort an kultivierten Körnerzellen als Modell dienen. Im "cell-attached" Modus der Patch-Clamp-Konfiguration soll die Reaktion von einzelnen Kaliumkanälen bei der Applikation von GABA untersucht werden.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Präparation der Oligodendrozytenkulturen

Die Oligodendrozyten-Primärkulturen wurden nach der Methode von Trotter et al. (Trotter et al., 1989) aus dem Gesamthirn von 14 bis 15 Tage alten Mausembryonen hergestellt. Trächtige NMRI (Naval Medical Research Institut) Mäuse (Tierstall des MDC, Berlin-Buch) wurden getötet, die Embryonen entnommen, dekapitiert und die Gehirne freipräpariert. Nach sorgfältiger Entfernung der Hirnhäute wurden die Gehirne dreimal mit HBSS⁺ (Hanks balanced salt solution, s. 3.1.3.) gewaschen und anschließend für eine Minute mit 1 % (10 mg/ml) Trypsin (Boehringer, Ingelheim, BRD) und 0,05 % (0,5 mg/ml) DNase (Worthington, Lakewood, NY) in HBSS⁻ behandelt. Nach einmaligem Waschen mit serumhaltigem BME-Medium (Kulturmedium Basal Medium Eagle, s. 3.1.3.) zur Beendigung der Trypsin-Reaktion wurden die Zellen durch Aufziehen mit verschiedenen rundgeschmolzenen Pasteurpipetten in Anwesenheit von 0,05 % DNase bis zum Erhalt einer Einzelzellsuspension weiter vereinzelt. Diese wurde anschließend zweimal mit HBSS⁻ gewaschen und mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen pro Flasche in 10 ml BME⁺ Medium in Poly-L-Lysin (PLL)-beschichtete Kulturflaschen ausplattiert. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-haltiger Atmosphäre im Brutschrank.

Die Neurone wurden nach fünf Tagen in Kultur durch Immunzytolyse abgetötet. Dazu wurden die Zellen in den Kulturflaschen mit dem monoklonalen Antikörper M5 (Keilhauer et al., 1985) inkubiert und danach für ca. 20 min mit komplement-aktivem Meerschweinenserum (7 %) behandelt.

Nach weiteren zwei bis drei Tagen besteht die Kultur aus einem konfluenten Astrozyten-Monolayer und darauf relativ locker sitzenden Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen. Durch leichtes Schütteln werden zunächst die locker haftenden Mikrogliazellen entfernt und nach Auffüllen des Kulturmediums durch starkes Schütteln die Oligodendrozyten in Lösung gebracht. Diese wurden mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Deckglas auf mit einem Astrozytenmonolayer bewachsenen Deckgläsern ausplattiert und in definiertem Medium nach SATO mit 1 % Pferdeserum für weitere 2-10 Tage kultiviert.

3.1.2 Präparation der Körnerzellkulturen

Die Herstellung der Körnerzellkulturen erfolgte aus sechs Tage alten NMRI Mäusen entsprechend der von Wilkin et al., 1976 und Levi (Levi et al., 1984) für Ratten beschriebenen Methode. Die Mäuse wurden dekapitiert und die Kleinhirne freipräpariert und von den Hirnhäuten befreit. Die Kleinhirne wurden dreimal in HBSS⁺ gewaschen und dann für 10 Minuten bei 37°C mit 1 % (10 mg/ml) Trypsin behandelt. Anschließend wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von serumhaltigem BME-Medium gestoppt und die Zellen in Anwesenheit von 0,05 % (0,5 mg/ml) DNase durch Aufziehen mit einer Pasteurpipette vereinzelt. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen mit einer Dichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen pro Deckglas auf mit PLL-beschichtete Deckgläser ausplattiert. Die weitere Kultivierung erfolgte in BME⁺ Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt im Inkubator. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten innerhalb von 7-15 Tagen *in vitro*.

3.1.3 Medien

Kulturmedium Basal Medium Eagle (BME⁺) Earle's:

BME Earle's	9,29 g/l (Seromed)
NaHCO ₃	2,20 g/l
Glukose	2,24 g/ml
Penicillin	10 000 U/l
Streptomycin	10 000 U/l
L-Glutamin	2 mM

BME⁺:

BME⁻-Lösung (siehe oben) mit 10 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Seromed/Gibco)

Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM):

DMEM	13,4 g/l (Serva)
HAM's F-12	10,6 g/l
NaHCO ₃	2,4 g/l
HEPES	3,6 g/l

Sato⁻-Medium

(Bottenstein und Sato, 1979, modifiziert nach Barres et al., 1993)

DMEM-Pulver	13,4 g/l (Serva)
NaHCO ₃	2 g/l
Transferrin	100 mg/l
Gentamycin	25 mg/l
Insulin	10 mg/l
Putreszin	100 nM
Progesteron	200 nM
3,3',5-Triiod-L-Thyronin	500 nM
Natriumselenit	220 nM
L-Thyroxin	500 nM

Sato⁺:

Sato⁻-Lösung (siehe oben) mit 1 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Seromed/Gibco)

Hanks' balanced salt solution (HBSS⁻)

NaCl	8,000 g
KCl	0,400 g/l
KH ₂ PO ₄	0,060 g
NaHCO ₃	0,350 g/l
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	0,113 g/l
Glucose	1,000 g/l
Phenolrot	0,005 g/l

pH mit NaOH auf 7,3 einstellen

HBSS⁺

HBSS⁻ (siehe oben) mit 1,5 g/l MgSO₄

3.2 Elektrophysiologie

3.2.1 Methodik

Die von Neher und Sakmann (Neher und Sakmann, 1976) entwickelte Patch-Clamp-Technik ermöglicht es, sowohl Membranströme der gesamten Zellmembran als auch den Strom einzelner Ionenkanäle zu messen (Überblick s. Hamill et al., 1981).

Bei dieser Technik wird eine Glasmikroelektrode (Spitzendurchmesser: 1-2 μm) in sehr engen Kontakt mit der Zellmembran gebracht. Die stabile Glas-Membran-Verbindung mit Widerständen im Gigaohm-Bereich bewirkt durch die elektrische Abschirmung des Membranstückes von seiner Umgebung ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis.

Die mechanische Stabilität dieser Glas-Membran-Verbindung erlaubt es auch, weitere mechanische Manipulationen durchzuführen, ohne die hochohmige Verbindung zu zerstören. Zur Untersuchung des durch die gesamte Zellmembran fließenden Stromes ("whole-cell"-Konfiguration) wird durch Anlegen eines Unterdruckes das in der Pipette liegende Membranstückchen zerrissen (Abb. 5) und man erhält einen niederohmigen Zugang zum Zellinneren.

Während der Ganzzellaufleitung tauscht sich die Pipettenlösung durch Diffusion rasch mit dem Zytoplasma aus, so daß die intrazellulären Ionenverhältnisse durch die Pipettenlösung vorgegeben werden.

Die Messung von Einzelkanalströmen erfolgt entweder auf der Zelle im „cell-attached-Modus“ oder mit von der Zelle abgetrennten Membranstücken im „inside-out“ Modus oder im „outside-out“-Modus (Abb. 5).

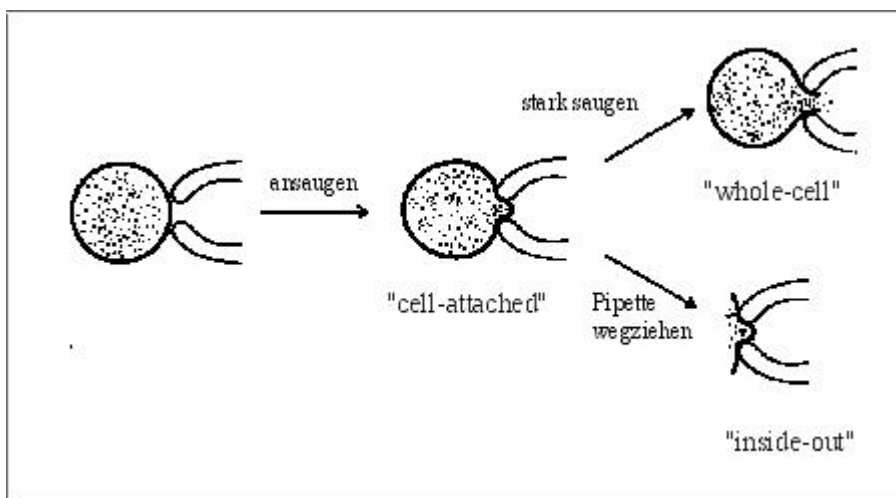


Abbildung 5
Patch-Clamp-Konfigurationen nach Hamill et al., 1981.

Nachdem die Patchpipette auf die Zelle aufgesetzt wurde (Zelle stark verkleinert dargestellt), stellt man durch vorsichtiges Saugen einen engen Pipetten-Membran-Kontakt (Gigaseal) her. In der "cell-attached" Konfiguration können die unter der Patchpipette befindlichen Kanäle untersucht werden. Durch starkes Saugen kann das Membranstück unter der Patchpipette zerstört werden. Man erhält dann einen leitenden Zugang zur gesamten Zelle und kann die Summenströme der gesamten Zellmembran untersuchen ("whole-cell" Konfiguration). Durch Wegziehen der Pipette aus der "cell-attached" Konfiguration kann man das unter der Pipette befindliche Membranstück von der restlichen Zelle abtrennen und kann bei freiem Zugang zur Zellsäule einzelne Ionenkanäle untersuchen ("inside-out" Konfiguration).

3.2.2 Patch-Clamp Elektroden

Die Elektroden wurden aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld, BRD) mit einem horizontalen Elektrodenziehgerät (Modell P-2000 und P87, Sutter Instruments, Novato, USA) gezogen. Für die Einzelkanalmessungen wurden Pipetten aus dickerwandigem Glas (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,75 mm) mit Pipettenwiderständen von 7-10 M Ω , für Ganzzelleableitungen Pipetten aus dünnerwandigem Glas (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,9 mm) mit Pipettenwiderständen von 4-7 M Ω verwendet.

3.2.3 Messplatz

Für die Patch-Clamp-Messungen wurde eine Meßapparatur bestehend aus einem aufrechten Mikroskop (Zeiss, Oberkochen), Videoüberwachungsanlage und einem über einen Mikromanipulator (SPI, Oppenheim, BRD) fernsteuerbaren Meßpipettenhalter mit Patch-Clamp-Verstärker (EPC 9) (Heka Elektronik, Lambrecht) aufgebaut.

Für die elektrophysiologischen Ableitungen wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen in eine auf den Mikroskop-Kreuztisch montierte Plexiglaskammer transferiert, die kontinuierlich mit Badlösung durchspült wurde (Durchflußrate ca. 3 ml/min). Über die Badperfusion wurden auch Blocker, Transmitter und andere Substanzen appliziert.

Als Elektroden wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet, die Referenzelektrode befand sich in der mit Badlösung durchspülten Meßkammer, die Meßelektrode in der mit Pipettenlösung gefüllten Meßpipette.

Die Zellen wurden über die Videoüberwachungsanlage ausgewählt und die Meßpipette mit Hilfe des Mikromanipulators auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch leichtes Ansaugen wurde dann eine stabile Glas-Membran-Verbindung im G Ω -Bereich (3-10 G Ω) hergestellt. Patch-Clamp-Untersuchungen wurden sowohl im Ganzzellmodus als auch im „cell-attached“ und „inside-out“ Modus (Hamill et al., 1981) durchgeführt. Die Membranströme der Zellen wurden mit einem EPC-9 Verstärker (Heka Elektronik, Lambrecht, BRD) verstärkt, mit 10 kHz aufgenommen, mit einem 3 kHz Tiefpass-Filter gefiltert, digitalisiert und auf der Festplatte eines Computers gespeichert. Da die Kapazität der Zellmembran Spannungsänderungen durch Umladeströme entgegenwirkt und damit eine zeitliche Verzögerung bewirkt, wurde eine automatische Kapazitätskompensation durchgeführt.

Die Aufnahme und Auswertung der Daten sowie die Ansteuerung des Verstärkers und des Mikromanipulators erfolgte mit dem Programm „Wintida“ (Heka Elektronik, Lambrecht, BRD). Es wurden verschiedene Spannungssprungprotokolle (s.u.) zur Stimulation von Membranströmen verwendet. Der Aufbau eines Patch-Clamp-Meßplatzes ist in Abb. 6 schematisch dargestellt.

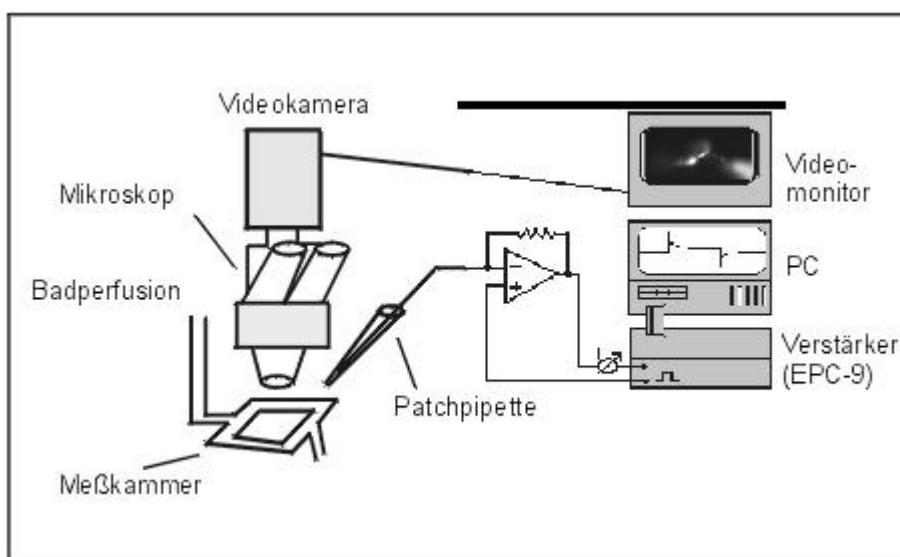


Abbildung 6
Aufbau eines elektrophysiologischen Meßplatzes.

Die Zellen befinden sich unter dem Mikroskop in einer kontinuierlich von Badlösung durchströmten Kammer. In der Patchpipette befindet sich die Meßelektrode, die mit dem Patch-Clamp-Verstärker

verbunden ist, die Referenzelektrode befindet sich in der Meßkammer. Der Verstärker stellt ein bestimmtes Potential (Haltepotential) zwischen den Elektroden ein und mißt den fließenden Strom.

3.2.4 Spannungssprungprotokolle

3.2.4.1 Erfassung der spannungsaktivierten Ströme (Spannungsprotokoll 1)

Dieses Protokoll wurde zur Charakterisierung der spannungsaktivierten Ströme der Zellmembran angewandt. Ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV wurde die Membran für jeweils 50 ms nacheinander auf 10 depolarisierende und 10 hyperpolarisierende Potentiale geklemmt (Abb. 7A). Das Spannungsintervall betrug pro Sprung 10 mV.

3.2.4.2 Erfassung der ligandenaktivierten Ströme (Spannungsprotokoll 2)

Spannungsprotokoll 2 wurde angewandt, um Änderungen der Leitfähigkeiten bei Applikation von Neurotransmittern zu messen. Vom Haltepotential (-70 mV) aus wurden Sequenzen von de- und hyperpolarisierenden Pulsen zu unterschiedlichen Potentialen (-35, -85, -10, -110, +15, -135, +40, -160, +65 mV) gestartet. Die Pulsdauer betrug 50 ms, die Pause zwischen den einzelnen Pulsen 100 ms. Die Gesamtdauer einer Sequenz betrug zwei Sekunden. Diese Sequenz wurde im Laufe einer Gesamtzeit von 10 Minuten jede sechs Sekunden wiederholt. Die resultierenden Ströme wurden kontinuierlich aufgezeichnet (Abb. 7B).

3.2.4.3 Erfassung von spannungsaktivierten Strömen, die spannungsabhängig inaktivieren (Spannungsprotokoll 3)

Die Aufhebung der Inaktivierung erfolgt durch Hyperpolarisierung. Vom Haltepotential (-70 mV) wurde die Membran zuerst auf -100 mV 400 ms lang hyperpolarisiert. Danach wurde wie bei Sprungprotokoll 1 fortgefahren (Abb. 7C).

3.2.4.4 Messung der "Steady-state"-Inaktivierung von spannungsaktivierten Strömen (Spannungsprotokoll 4)

Um die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Strömen zu messen, wurden nacheinander de- und hyperpolarisierende 3 s lange Präpulse gestartet und die Membran anschließend auf +20 mV geklemmt. Die Vorpuls-Potentiale betrugen zwischen -130 mV bis +10 mV mit einem Spannungsintervall von 10 mV (Abb. 7D).

3.2.4.5 Spannungsrampen

Zur Erfassung der Spannungsabhängigkeit insbesondere von Einzelkanalströmen wurden Spannungsrampen verwendet. Dabei wurde das Pipettenpotential innerhalb von 1s kontinuierlich von 120 mV Hyperpolarisierung zu 120 mV Depolarisierung variiert (Abb. 7E).

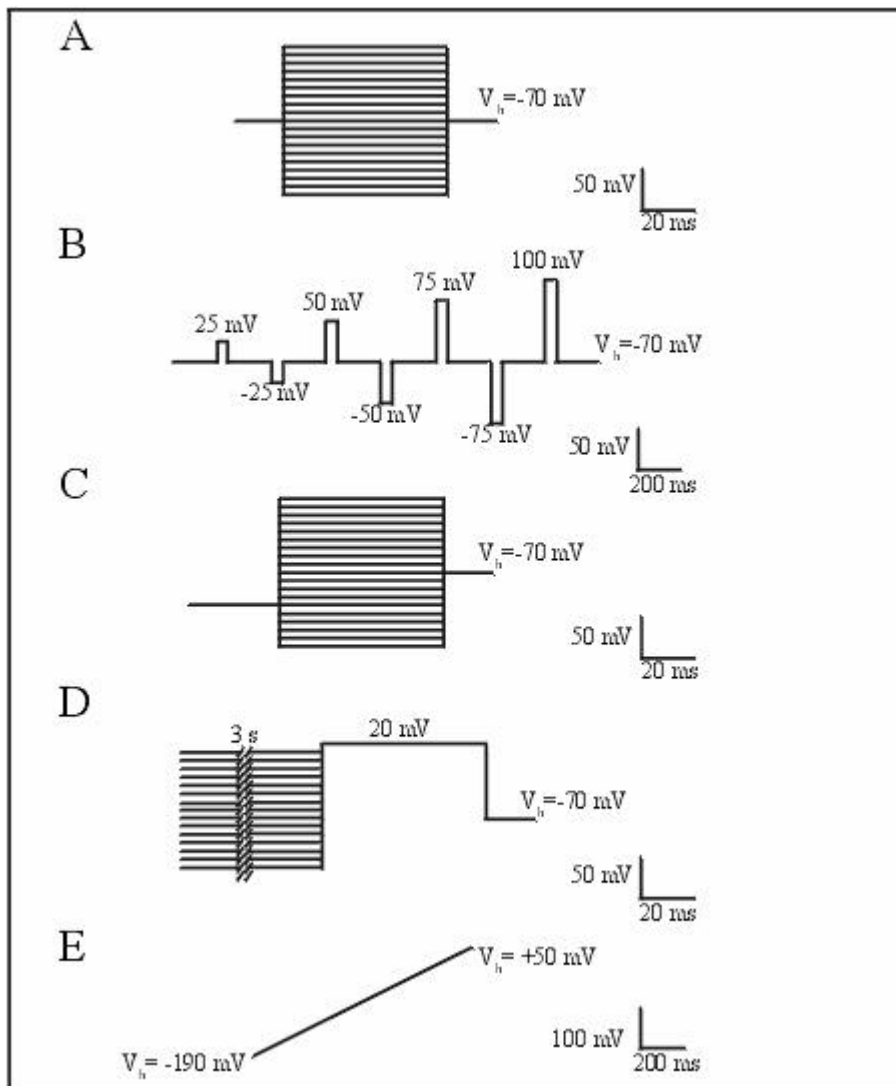


Abbildung 7

Spannungssprungprotokolle zur elektrophysiologischen Charakterisierung von Membranströmen mit der Patch-Clamp-Technik

- A) Spannungssprungprotokoll zur Erfassung der spannungsaktivierten Ströme
- B) Spannungssprungprotokoll zur Erfassung von ligandenaktivierten Strömen
- C) Spannungssprungprotokoll zur Erfassung von spannungsaktivierten Strömen mit spannungsabhängiger Inaktivierung
- D) Protokoll zur Messung der "steady-state-" Inaktivierung von Membranströmen
- E) Spannungsrampe

3.2.5 Lösungen

a) Badlösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde als Standard-Badlösung eine HEPES-gepufferte Salzlösung mit folgender Zusammensetzung verwendet:

NaCl	150 mM
KCl	5,4 mM
CaCl ₂	2,0 mM
MgCl ₂	1,0 mM
HEPES	5,0 mM

Glukose 10 mM

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH auf 7,3 eingestellt.

b) Pipettenlösungen

Für die Ganzzellaufleitungen wurde, soweit nicht anders angegeben, folgende dem intrazellulären Ionenniveau entsprechende Pipettenlösung verwendet:

KCl 130 mM

CaCl₂ 1,0 mM

MgCl₂ 2,0 mM

EGTA 10 mM

HEPES 10 mM

Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von KOH auf 7,3 eingestellt und in einem Teil der Experimente wurde 0,1 % des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer gelb hinzugefügt.

Für die Einzelkanalmessungen im „cell-attached-“ (sowie im „outside-out-“) Modus wurde die Standard-Badlösung als Pipettenlösung verwendet.

3.2.6 Pharmakologie

Zur pharmakologischen Charakterisierung der Kaliumströme wurden elektrophysiologische Untersuchungen mit verschiedenen Kaliumkanalblockern durchgeführt. Die Substanzen mit Ausnahme von CTX, DTX und MCDP wurden über die Badperfusion appliziert.

4-Aminopyridin (4-AP, 0,125 bis 1 mM) wurde direkt in der Standardbadlösung verdünnt und über die Badperfusion appliziert. Tetraethylammonium (Chlorid-Salz, 1-100 mM) wurde in der Standardbadlösung isoosmolar gegen NaCl ausgetauscht und über die Badperfusion appliziert. Die in geringen Konzentrationen wirksamen K⁺ Kanalblocker Charybdotoxin (CTX), α -Dendrotoxin (DTX), MCDP (mast cell degranulating peptide) sowie Chinidin wurden in geringen Volumina destilliertem Wasser gelöst und dann in Badlösung verdünnt. CTX, DTX und MCDP wurden mit einer Pipette direkt in die Perfusionskammer appliziert.

In einigen Experimenten wurden Natriumkanäle durch die Zugabe von 100 nM Tetrodotoxin (TTX) geblockt. Bei den Einzelkanalexperimenten in "inside-out-" Modus wurde eine der normalen intrazellulären Pipettenlösung entsprechende Badlösung verwendet. Bei einem Teil dieser Experimente wurde ein Teil der KCl-Konzentration durch erhöhte NaCl-Konzentrationen ersetzt.

Die Neurotransmitter sowie ihre Agonisten und Antagonisten wurden je nach Löslichkeit in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Muscimol, Bicucullin) oder destilliertem Wasser (GABA, Kainat) gelöst und in Badlösung verdünnt.

3.3 Immunzytochemische Analyse der Kaliumkanäle und oligodendrozytenspezifischen Marker

a) Indirekte Immunfluoreszenz

Färbung extrazellulärer Antigene

Zum spezifischen Nachweis für das Vorhandensein bestimmter Antigene (Oligodendrozyten-Zellmarker) und zur Analyse der Kaliumkanalexpression wurden Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zuerst zum Absättigen unspezifischer Bindungen für 10 Minuten mit serumhaltigem Medium (10 %) vorinkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen für 20 min mit dem Primärantikörper, verdünnt in serumhaltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum dreimal mit PBS gewaschen und mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser für 15 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert, dann dreimal mit PBS gewaschen und mit Aqua dest. gespült und auf einen Objektträger in einem Eindeckelmedium bestehend aus 76,9 g/l Movioll 4.88 (Hoechst), 2,5 % Diazabicyclo-[2.2.2]-Octan (DABCO) und 31 % Glycerin in 0,1 M PBS eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte unter dem

Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, BRD), ausgestattet mit den entsprechenden Filtern.

Färbung intrazellulärer Antigene

Bei einer Färbung von intrazellulären Antigenen wurden die Zellen zuerst für 25 Minuten in 4 % Paraformaldehyd fixiert und dann dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Lösung von 1 % Triton X-100 und 3 % Ziegen Serum (NGS) in 0,1 M Phosphatpuffer für 10 Minuten vorinkubiert. Danach wurde der Primärantikörper, verdünnt in einer Lösung aus 0,2 % Triton X-100 und 3 % NGS in 0,1 M Phosphatpuffer für 25 Minuten dazugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M Phosphatpuffer wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper, wiederum verdünnt in 0,2 % Triton X-100 und 3 % NGS in 0,1 M Phosphatpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen, mit Aqua dest. gespült und auf einen Objektträger in einem Eindeckelmedium (wie oben beschrieben) eingebettet und unter den Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, BRD), ausgestattet mit den entsprechenden Filtern, ausgewertet und fotografiert.

b) ABC-DAB-Färbetechnik

Zum Nachweis der Maus-Kv1-Proteine wurde die ABC-DAB/Ni-Färbetechnik (siehe u.a. Trojanowski et al., 1983) angewendet.

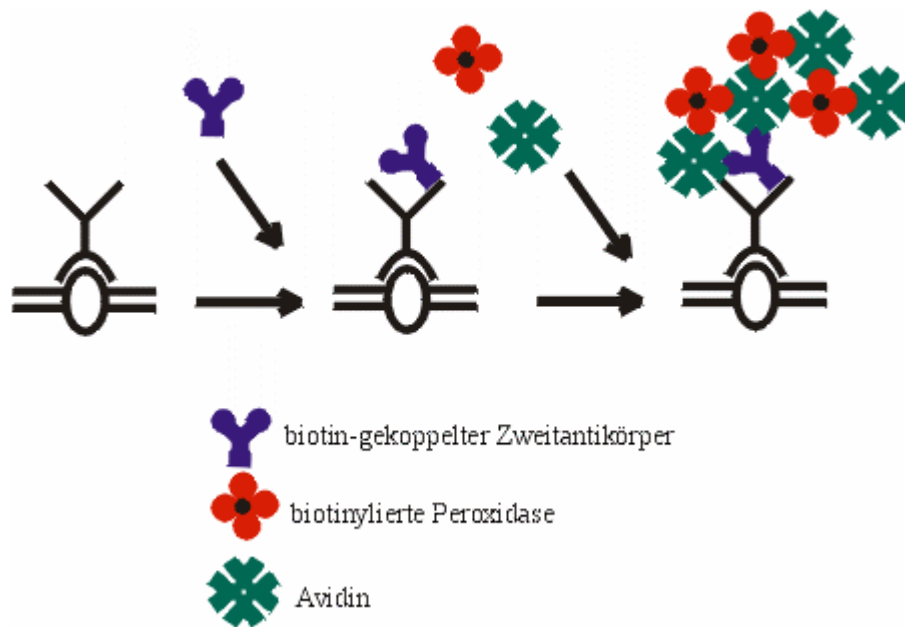


Abbildung 8

Prinzip der immunzytochemischen Analyse mit der Avidin-Biotin-Technik.

Nach der Bindung des Primärantikörpers an das zu untersuchende Antigen wird dieser durch einen biotinylierten sekundären Antikörper erkannt. Durch die Zugabe von Avidin und biotin-gekoppelter Peroxidase entstehen durch die hohe Avidin-Biotin-Bindungsaffinität große Komplexe. Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Verstärkung des Ausgangssignals.

Zuerst wurden die Deckgläser mit den Zellen mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und dann für 30 Minuten in einer Lösung aus 4 % Paraformaldehyd, 0,05 % Glutaraldehyd und 0,2 % Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum mit Phosphatpuffer gewaschen und für 1-7 Tage bei 4°C aufbewahrt. Die Färbungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dirk Eulitz und Prof. Dr. R. Veh vom Institut für Anatomie der Charité Berlin.

Die Deckgläser mit den Zellen wurden nochmals zweimal für 15 min mit PBS gewaschen. Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Oligodendrozyten für 30 min in einer Phenylhydrazinlösung (0,3 % Triton X-100, 10 % NGS und 5 ml Phenylhydrazin in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden dann direkt in die Primärantikörperlösung (in der entsprechenden Verdünnung in 0,3 %

Triton X-100, 10 % NGS, 0,1 % Natriumazid, 0,01 % Ethylmercurthiosalicylsäure (Thimerosal) in PBS) überführt und für ca. 12 Stunden (über Nacht) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (10 min und 20 min) in PBS und Vorinkubation für 30 min in 2 % Rinderserumalbumin (BSA) in PBS wurden die Zellen für nochmals ca. 12 Stunden in der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Der Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit, biotinyliert, Vector/Camon) wurde mit einer Verdünnung von 1:2000 in einer Lösung von 2 mg/ml BSA und 0,1 % Natriumazid in PBS verdünnt. Nach zweimaligem Waschen (10 min und 20 min) in PBS und Vorinkubation für 30 min von 2 mg/ml BSA in PBS wurde der nach Vorschrift angesetzte Elite ABC Komplex (Vector/Camon) für 6 h dazugegeben. Nach zweimaligem Waschen (10 min und 20 min) in PBS wurden die Oligodendrozyten für 15 min in einer Lösung von 50 mM Tris und 10 mM Imidazol in H₂O vorinkubiert und dann die Farbreaktion durch die Zugabe von 0,015 % H₂O₂ und 0,3 % Ammoniumnickelsulfat gestartet. Nach 5-10 min wird die Farbreaktion mit 500 µl PBS und zweimaligem Auswaschen mit PBS gestoppt.

Zum Entwässern wurden die Deckgläser mit den Oligodendrozyten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 80, 96, 100, 100 %) (Dauer pro Stufe ca. 10 Sekunden) in Xylol überführt und anschließend in Entellan (Merck, Darmstadt, BRD) eingebettet.

Die Primärantikörper Kv1.1, Kv1.3 und Kv1.6 wurden im Labor von R. Veh (AG Elektronenmikroskopie, Institut für Anatomie, Charité Berlin) hergestellt (Ref. s. Veh et al., 1995). Die Primärantikörper Kv1.2, Kv1.4 und Kv1.5 wurden von der Firma Alomone labs (Israel) bezogen.

Die Verdünnungen für die Primärantikörper waren:

rabbit-anti-Kv1.1	1:500
rabbit-anti-Kv1.2	1:1000
rabbit-anti-Kv1.3	1:50
rabbit-anti-Kv1.4	1:500
rabbit-anti-Kv1.5	1:100
rabbit-anti-Kv1.6	1:500

3.4 Einzelzell-PCR

Die PCR-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. F. Kirchhoff (MDC, FG "Zelluläre Neurowissenschaften, Berlin-Buch) durchgeführt. Die Gewinnung des Zytoplasmas sowie die reverse Transkription erfolgten im wesentlichen wie bei Lambolez et al. (Lambolez et al., 1992) beschrieben.

a) Patch-Clamp-Untersuchung und Gewinnung der RNA

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Zellen wurden zuerst Messungen im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Konfiguration durchgeführt. Nach Beendigung der Messung wurde das Zytoplasma in die mit 8 µl steriler Pipettenlösung gefüllte Patchpipette eingesaugt. Unmittelbar nach der Messung wurde der Inhalt der Patchpipette in ein PCR-Röhrchen mit folgendem Inhalt überführt: 1 µl (40 U/µl) RNase-Inhibitor, 1 µl (10 U/µl) DNase, 1 µl (1 M) NaAcetat und 1 µl (25 mM) MgCl₂. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit genomischer DNA aus dem Zellkern wurde die Probe dann für 10 min bei 37 °C mit DNase (10 U/µl, RNase-frei) inkubiert. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Während der gesamten Arbeiten wurden sterile Bedingungen eingehalten.

Die RNA wurde entsprechend der Methode von Chomczynski (Chomczynski, 1993) gewonnen. Dabei wurde das Material zuerst durch Zugabe von 100 µl Trizol für 10 min bei Raumtemperatur homogenisiert, dann mit 20 µl Chloroform und 0,3 µl Glykogen (20 mg/ml) gemixt und anschließend bei 4 °C 10 min bei 14000 g abzentrifugiert. Anschließend wird die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, in ein PCR-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 30 µl Isopropanol für 10 min präzipitiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 150 µl Ethanol und anschließende Zentrifugation für 3 min bei 14000 g wird die Probe zweimal gewaschen und überbleibende Reste von Ethanol werden durch Lufttrocknung entfernt. Anschließend wird die Probe in 10 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser aufgenommen.

b) Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird durch das Enzym reverse Transkriptase (Superscript Gibco, BRL) von der mRNA-Matrize komplementäre DNA hergestellt. In Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers setzte sich ein Reaktionsansatz wie folgt zusammen: 0,5 µl (0,5 mM) dNTP's, 1 µl (50 µM) random Hexamer-Primer, 0,5 µl (15 U) RNase-Inhibitor, 1 µl (100 U) reverse Transkriptase, 1 µl (10 mM) Dithiothreitol (DTT), 4 µl DEPC-H₂O und 2 µl 5x Erststrang-Puffer, zuzüglich der in 10 µl Tris-EDTA (Ethyldiaminotetraessigsäure) aufgenommenen Probe.

Die Ansätze wurden für jeweils 90 min bei 42° im Brutschrank inkubiert und danach entweder sofort in einer PCR eingesetzt oder bei -20 °C eingefroren.

c) PCR

Zur Amplifikation der Kv1-spezifischen cDNA-Sequenzen wurden zwei PCR-Zyklus-Serien mit sogenannten „semi-nested“ Primerpaaren durchgeführt. Dafür wurde ein Sense-Primer aus der 3. Transmembrandomäne (S3) und ein Antisense-Primer aus der Porenregion sowie ein weiterer Antisense-Primer aus der 6. Transmembrandomäne (S6) verwendet, die im Maus-Kv1-Gen stark konserviert sind. Die Sequenzen der Primer waren wie folgt:

Sense-Primer: Kv1-S3 5'-cct tac ttt atc acc ctg gg-3'

Antisense-Primer: Kv1-p 5'-gtc atg gtt acc act gcc cac ca-3'

Kv1-S6 5'-cac aga gag ccc aca atc ttg ccc cc-3'

In der ersten Amplifikationsrunde wurde das Primerpaar Kv1-S3 und Kv1-S6 verwendet. Danach wurden die die Produkte der ersten PCR Runde einer weiteren PCR mit dem Primerpaar Kv1-S3 und Kv1-P unterworfen.

Der Reaktionsansatz für die PCR setzte sich wie folgt zusammen: 20 mM Tris/HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 2 µl (0,1 µM) je Sense-und Antisense-Primer, 2,5 U Taq Polymerase zuzüglich der Probe (cDNA).

Bei der ersten PCR wurde das verwendete PCR-Gerät (Perkin Elmer Thermocycler 9600) während der ersten Denaturierungsphase 5 min auf 94 °C gesetzt, dann folgten 40 Zyklen zur Amplifikation (60 s bei 94 °C zur Denaturierung, 30 s bei 50 °C zum "Annealing" und 30 s bei 72 °C zur Elongation). Nach dem letzten Elongationsschritt folgten 10 min bei 72 °C zur Endsynthese, danach wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt. und entweder sofort analysiert oder bei -20 °C eingefroren.

Um alle in einer Zelle vorhandenen Kv1-Transkripte gleichzeitig nachweisen zu können, wurden die Primer so ausgewählt, daß sich die amplifizierten Kv1 Fragmente durch ihre Länge unterscheiden:

Kv1.1 323 Basenpaare
Kv1.2 326 Basenpaare
Kv1.3 317 Basenpaare
Kv1.4 329 Basenpaare
Kv1.5 332 Basenpaare
Kv1.6 347 Basenpaare

Die nach der PCR erhaltenen Kv1-Fragmente können anschließend aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt werden. Da eine Agarose-Gelelektrophorese nicht die nötige Trennschärfe erbrachte, wurde die Auftrennung mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes durchgeführt. Durch die Nutzung von Fluorescein-isothiocyanat-konjugierten Kv1-S3 Primern wurden fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte erhalten. Diese wurden dann durch Kapillarelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Kapillar-Sequencer ABI 310, POP4) aufgetrennt und der relative Mengenanteil der einzelnen Kv1 Transkripte bestimmt (GeneScan Software package).

Als Positivkontrolle wurden cDNA-Proben aus Maus-Gesamthirn anstatt von RNA aus individuellen Zellen verwendet. Als Negativkontrolle dienten die als Pipettenlösung verwendete gepufferte Salzlösung sowie Zytoplasma-Proben von Mikrogliazellen, die keine Kv1-Gene exprimieren.

4 Ergebnisse

4.1 Shaker-Kaliumkanäle auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

4.1.1 Charakterisierung der Zellkultur

Als Modellsystem für die Untersuchungen wurden Oligodendrozyten-Vorläuferzellkulturen der Maus genutzt. Die Primärkulturen aus dem Gesamthirn von 14 Tage alten Maus-Embryonen wurden nach ca. 14 Tagen in Kultur auf einem Monolayer von Astrozyten ausplattiert und dann innerhalb von 2-7 Tagen für die Messungen verwendet. Unter diesen Kulturbedingungen bleibt durch das von den Astrozyten konditionierte Medium der Anteil der undifferenzierten Vorläuferzellen hoch (Raff et al., 1988). Oligodendrozytenvorläuferzellen lassen sich aufgrund ihrer Morphologie (s. Abb. 9) gut von dem darunterliegenden Astrozytenrasen unterscheiden.

Zur Feststellung des Differenzierungsgrades der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurde durch immunozytochemische Färbungen (s. Material und Methoden) die Expression von stadienspezifischen Antigenen getestet. Alle Zellen zeigten eine positive Expression des Intermediärfilaments Vimentin, wie sie für gliale Vorläuferzellen charakteristisch ist (Fanarraga et al., 1995). Die Expression des GD3-Antigens (Curtis et al., 1988) ist für frühe Vorläuferzellen typisch. In den verwendeten Zellkulturen exprimieren 17,3 % ($\pm 4,7$ %, $n(\text{Zellen})=1008$; $N(\text{Experimente})=4$) der Zellen das GD3-Antigen. Morphologisch sind diese Zellen durch einen relativ kleinen Zellkörper (<10 μm) und nur wenige Ausläufer charakterisiert (Abb. 8 A, B). Zellen, die das O4-Antigen (Sommer und Schachner, 1981) exprimieren, sind bereits etwas größer und besitzen weiter verzweigte Ausläufer (Abb. 8 C, D). Diese werden als späte Vorläuferzellen bezeichnet. Der Anteil dieser Zellen in der Kultur nimmt kontinuierlich zu, im untersuchten Zeitraum waren 28,7 % ($\pm 9,4$ %, $n=2056$, $N=8$) der Zellen O4-positiv. Zellen, die das für frühe Oligodendrozyten typische O1 Antigen exprimierten, waren in der Zellkultur nur in geringen Mengen vorhanden (9,2 % $\pm 2,6$ %, $n=879$, $N=4$). Diese Zellen sind morphologisch durch relativ große Zellkörper und weitverzweigte Ausläufer gekennzeichnet (Abb. 8 E, F). Bei keiner der Zellen konnte die Expression des für reife Oligodendrozyten typischen O10-Antigens festgestellt werden.

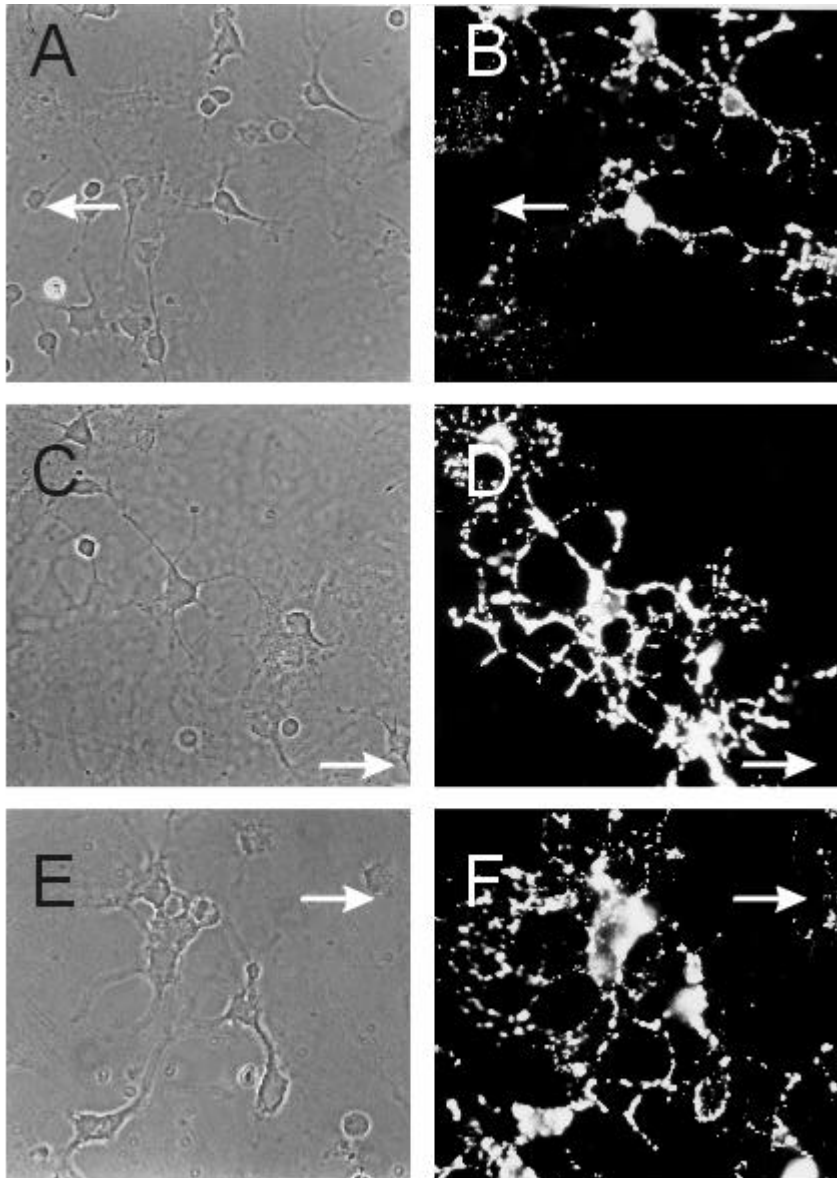


Abbildung 9

Immunocytochemische Charakterisierung der Kultur anhand stadienspezifischer Antigene

Zur Bestimmung des Differenzierungsgrades der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurde mit indirekten Immunfluoreszenzfärbungen die Expression von stadienspezifischen Antigenen getestet.

Die Expression des GD3-Antigens ist für relativ frühe Vorläuferzellen charakteristisch. Diese zeichnen sich morphologisch durch einen relativ kleinen Zellkörper und nur wenige Ausläufer aus (A-Phasenkontrastaufnahme, B-Fluoreszenzbild desselben Bildausschnitts).

In den verwendeten Zellkulturen exprimierten 29 % der Zellen das für späte Vorläuferzellen typischen O4-Antigen (C-Phasenkontrastaufnahme, D-Fluoreszenzbild desselben Bildausschnitts).

Die Expression des für frühe Oligodendrozyten typischen O1-Antigens beginnt nach ca. 15 Tagen in Kultur (E-Phasenkontrastaufnahme, F-Fluoreszenzbild desselben Bildausschnitts).

4.1.2 Eigenschaften der Auswärtsströme

Die Membranströme von kultivierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik im „whole-cell“-Modus (Hamill et al., 1981) innerhalb von 2 bis 7 Tagen nach Abschütteln von den Kulturflaschen untersucht. Das Ruhemembranpotential der Zellen betrug direkt nach Erreichen der „whole-cell“-Konfiguration $V_m = -53 \text{ mV}$ ($\pm 16 \text{ mV}$, $n=176$).

In allen Zellen wurden durch depolarisierende Spannungssprünge zu Potentialen positiver als -40 mV auswärts rektifizierende Kaliumströme aktiviert. Die mittlere Stromdichte betrug bei der Aktivierung durch einen depolarisierenden Spannungssprung auf $+20 \text{ mV}$ $117,4 \text{ pA/pF}$ (± 63 , $n=26$). In den meisten Zellen (93 %) inaktivierte ein Teil dieses Stromes (35% des Peak-Stromes $\pm 17\%$, $n=27$) innerhalb von 50 ms. Der Zeitverlauf der zeitlichen Inaktivierung folgt einer fallenden Exponentialfunktion mit der Zeitkonstante $\tau = 34,21 \text{ ms}$ ($\pm 4,19$, $n=10$) (s. Gl. 1). Der inaktivierende Anteil der Ströme lässt sich vom nicht inaktivierenden Anteil trennen, indem der durch einen depolarisierenden Spannungssprung hervorgerufene Strom mit einer Exponentialfunktion

$$I_m = I_n + I_0 * e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (\text{Gl. 1})$$

angepasst wird (I_m : Membranstrom, I_n : konstanter Stromanteil, t : Zeit, τ : Zeitkonstante der Inaktivierung). Der konstante Anteil entspricht dann dem zeitlich nicht inaktivierenden Anteil des Stromes (Abb. 10).

Die bei hyperpolarisierenden Potentialen aktivierten Einwärtsströme waren mit $26 \% \pm 23 \%$ ($n=27$) des Gesamtzellstromes sehr klein (Stromdichte: $37,6 \pm 43,6 \text{ pA/pF}$, $n=26$). Das Verhältnis der Einwärtsströme zu den Auswärtsströmen wird als Rektifizierungsindex bezeichnet. Dieser ist bei den weniger weit entwickelten Zellen sehr klein und wird dann mit zunehmender Zelldifferenzierung eins (oder etwas größer). Bei den untersuchten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen betrug der mittlere Rektifizierungsindex $0,35 (\pm 0,39; n=27)$.

Zur Messung des Umkehrpotentials der Ströme wurden sog. „tail-current“-Protokolle (siehe Material und Methoden) angewendet. Das so gemessene Reversionspotential der Membranströme betrug $R_p = -61,33 \text{ mV}$ ($n=8$) und liegt nahe bei dem für die verwendete Bad- und Pipettenlösung errechneten Nernstpotential für K^+ von -80 mV .

Zur Untersuchung der steady-state-Aktivierungseigenschaften der Kalium-Auswärtsströme wurden die Zellen ausgehend vom Haltepotential von -70 mV für jeweils 50 ms auf eine Serie von depolarisierenden Spannungen (-70 mV bis $+80 \text{ mV}$) geklemmt. Die resultierenden Membranströme wurden entsprechend der Gleichung $G_k = I_k / (V_{\text{mem}} - E_k)$ in Leitfähigkeiten umgerechnet. Die jeweiligen Leitfähigkeiten wurden auf die maximale Leitfähigkeit der Zelle G_{max} normiert. Bei Auftragung der G/G_{max} -Werte gegen das Membranpotential ergaben sich sigmoide Leitfähigkeits-Spannungskurven. (s. Abb. 10 E) Um die Spannung der halbmaximalen Kanalaktivierung zu erhalten, wurden diese Kurven mit sigmoiden Boltzmann-Funktionen (4 Parameter)

$$\frac{G}{G_{\text{max}}} = \frac{V_1 - V_2}{1 + e^{\frac{V_m - V_{1/2}}{dV}}} + P \quad (\text{Gl. 2})$$

gefitet (V_m : Membranpotential, dV : Steilheit der Inaktivierung $V_{1/2}$: halbmaximale Inaktivierungsspannung, P : Anteil der nicht inaktivierenden Stromkomponente). Für die von uns untersuchten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ergab sich eine halbmaximale Kanalaktivierung bei $V_{1/2} = -1 \text{ mV}$ ($\pm 6,4 \text{ mV}$, $n=28$).

Die Spannungsabhängigkeit der steady state-Inaktivierung wurde mit Hilfe eines Vorpuls-Stimulationsprotokolls (s. Spannungssprungprotokoll 4, Material und Methoden bzw. Abb. 7d) untersucht. Nach verschiedenen Vorpulsen (-130 mV bis $+10 \text{ mV}$ für 300 ms) wurde die Membran für 50 ms auf $+20 \text{ mV}$ geklemmt und die resultierenden Ströme gemessen. Es wurden wiederum die Leitfähigkeiten errechnet, normiert und gegen das Vorpuls-Potential aufgetragen. Bei allen untersuchten Zellen ergab sich ein biphasischer Verlauf der Inaktivierungskurven. Für den Fit wurde eine Summe aus zwei Boltzmannfunktionen verwendet (7 Parameter).

$$\frac{G}{G_{\max}} = \frac{V_1 - V_2}{1 + e^{\frac{V_m - V_{1/2}}{dV}}} + \frac{U_1 - U_2}{1 + e^{\frac{V_m - U_{1/2}}{dU}}} + P \quad (\text{Gl. 3})$$

(V_m : Membranpotential, dV bzw. dU : Steilheit der Inaktivierung $V_{1/2}$ bzw. $U_{1/2}$: halbmaximale Inaktivierungsspannung, P : Anteil der nicht inaktivierenden Stromkomponente). Der größere Anteil des Gesamtstromes ($52 \% \pm 14 \%$, $n=19$) inaktivierte mit einer halbmaximalen Inaktivierungsspannung von $V_{1/2} = -60 \text{ mV}$ ($\pm 6 \text{ mV}$, $n=19$), während eine zweite Stromkomponente ($35 \% \pm 19 \%$, $n=19$) erst bei positiveren Vorpulspotentialen ($-12 \text{ mV} \pm 8 \text{ mV}$, $n=19$) inaktivierte. 13% des Gesamtzellstromes ($\pm 13 \%$, $n=19$) zeigte keine spannungsabhängige Inaktivierung. Die biphasische Inaktivierungskurve deutet auf das Vorhandensein von mindestens zwei Kanalpopulationen mit unterschiedlichen Inaktivierungseigenschaften hin. Die Anteile der unterschiedlichen Stromkomponenten variierte bei den verschiedenen Zellen stark.

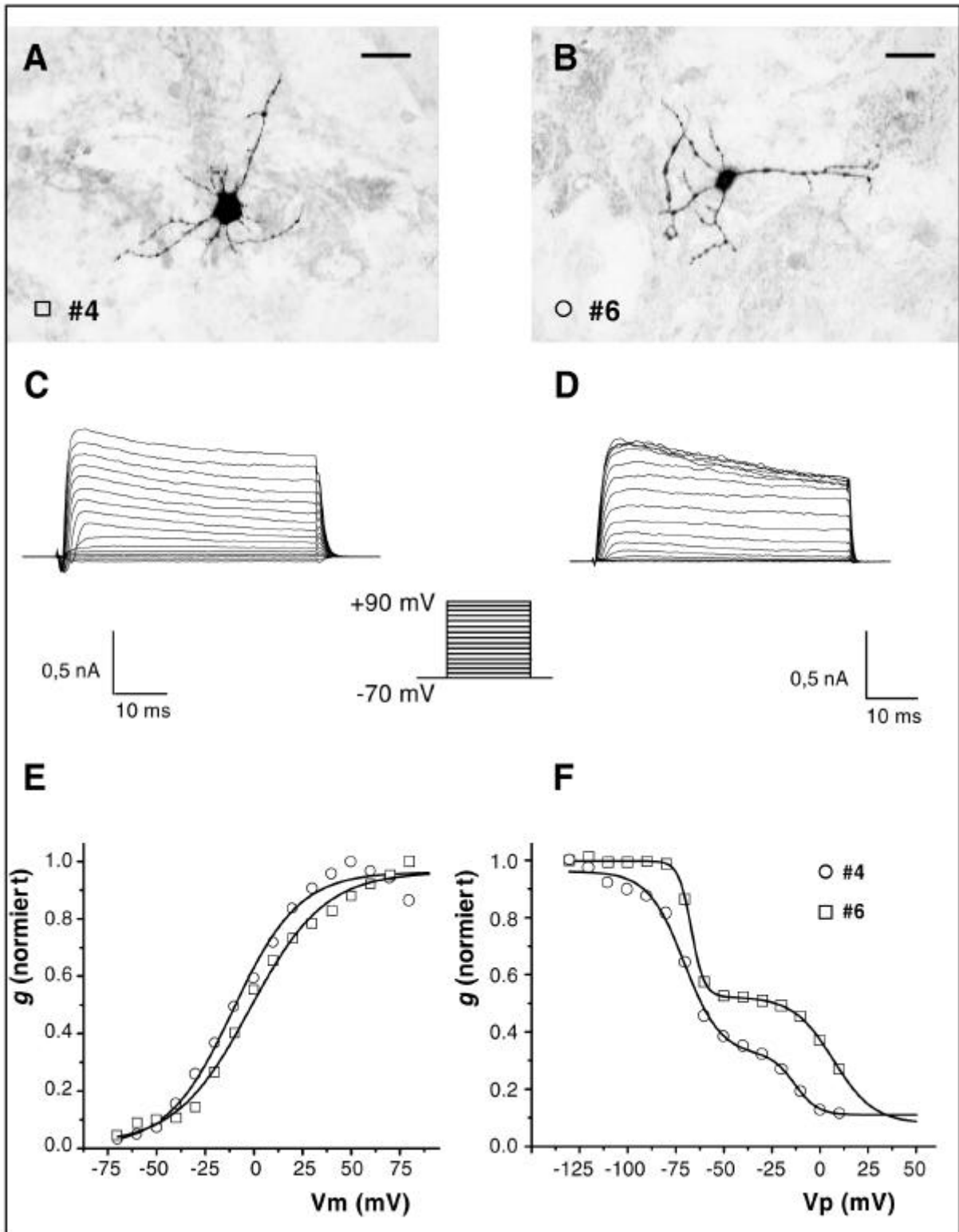


Abbildung 10
Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung von kultivierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Maus

Zur Charakterisierung der Zellmorphologie wurden kultivierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen während der elektrophysiologischen Untersuchung im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik mit dem Fluoreszenzfarbstoff Luzifer Gelb gefüllt. Anschließend wurde die Färbung mit einem gegen den Farbstoff gerichteten Antikörper mit Hilfe der Avidin-Biotin-Peroxidase Technik dargestellt. Die Zellkörper waren zwischen 8 und 15 µm groß und besaßen wenige (2-8) relativ schwach verzweigte Ausläufer. Zwei typische Zellen sind in A) und B) dargestellt. Der Balken entspricht 20 µm.

Zur Aktivierung von auswärts rektifizierenden Strömen wurden die Zellen ausgehend vom Haltepotential von -70 mV für 50 ms auf verschiedene depolarisierende Potentiale (von -70 mV bis +90 mV) geklemmt. Ab ca. -40 mV werden zeitlich leicht inaktivierende Auswärtsströme aktiviert (C und D für die oben dargestellten Zellen). Die Strom-Spannungs-Kurve der Ströme ist in E) dargestellt. Zur Untersuchung der Kanalinaktivierung wurde ein Vorpuls-Stimulationsprotokoll (s. Material und Methoden, 3.2.4.4.) verwendet. Die biphasische Inaktivierungskurve spricht für das Vorhandensein von zwei Kanalpopulationen mit unterschiedlichen Inaktivierungseigenschaften (F).

Kultivierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen besitzen also spannungsaktivierte, auswärts rektifizierende Kaliumströme mit relativ langsamer Inaktivierung. Diese Ströme lassen sich durch die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung sowie der Kanalinaktivierung und durch das Zeitverhalten der Inaktivierung beschreiben.

4.1.3 Pharmakologie der K⁺-Auswärtsströme

Zur weiteren Charakterisierung der Kaliumströme wurden die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen während der Patch-Clamp-Untersuchung im Ganzzellmodus mit einer Reihe von Kaliumkanalblockern behandelt. Dabei konnte durch keinen der gängigen Kaliumkanalblocker eine vollständige Hemmung der Kaliumströme erreicht werden.

Durch Tetraethylammoniumchlorid (TEA, 1-100 mM) wurden die nicht inaktivierenden Ströme geblockt. Der im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Konfiguration bei einer Membrandepolarisation auf +20 mV aktivierte Strom (Peakstrom, I_p) wird durch die extrazelluläre Applikation von 100 mM TEA auf 57,5 % des Kontrollstromes reduziert. Um die inaktivierenden bzw. nicht inaktivierenden Stromanteile zu bestimmen, wurde der durch einen Spannungssprung aktivierte Strom mit einer fallenden Exponentialfunktion

$$I_m = I_n + I_0 * e^{-\frac{t}{\tau}}$$

angepasst (I_m : Membranstrom, I_n : konstanter Stromanteil, t : Zeit, τ : Zeitkonstante der Inaktivierung). Der konstante Anteil (I_n) entspricht dem zeitlich nicht inaktivierenden Stromanteil, die Differenz zwischen diesem und dem Peakstrom ist der inaktivierende Anteil des Stromes (I_i). Die Dosis-Wirkungskurve in Abb. 11 C zeigt, daß der nicht inaktivierende Strom in Abhängigkeit von der TEA-Konzentration gehemmt wird (65 % Reduktion), während der inaktivierende Strom keine signifikanten Änderungen zeigt (25 % Reduktion). Aus der Dosis-Wirkungskurve für den Gesamtstrom (I_p , Peakstrom) wurde die halbmaximale Dosis für den Block durch TEA bestimmt. Diese ergibt sich als der Konzentrationswert der angepaßten Exponentialfunktion an der Stelle der halben Differenz zwischen dem Kontrollwert des Stromes (bei 0 mM TEA) und der Asymptote der Exponentialfunktion. Für den Block des Gesamtzellstromes durch TEA betrug die halbmaximale Dosis I_{50} =29 mM.

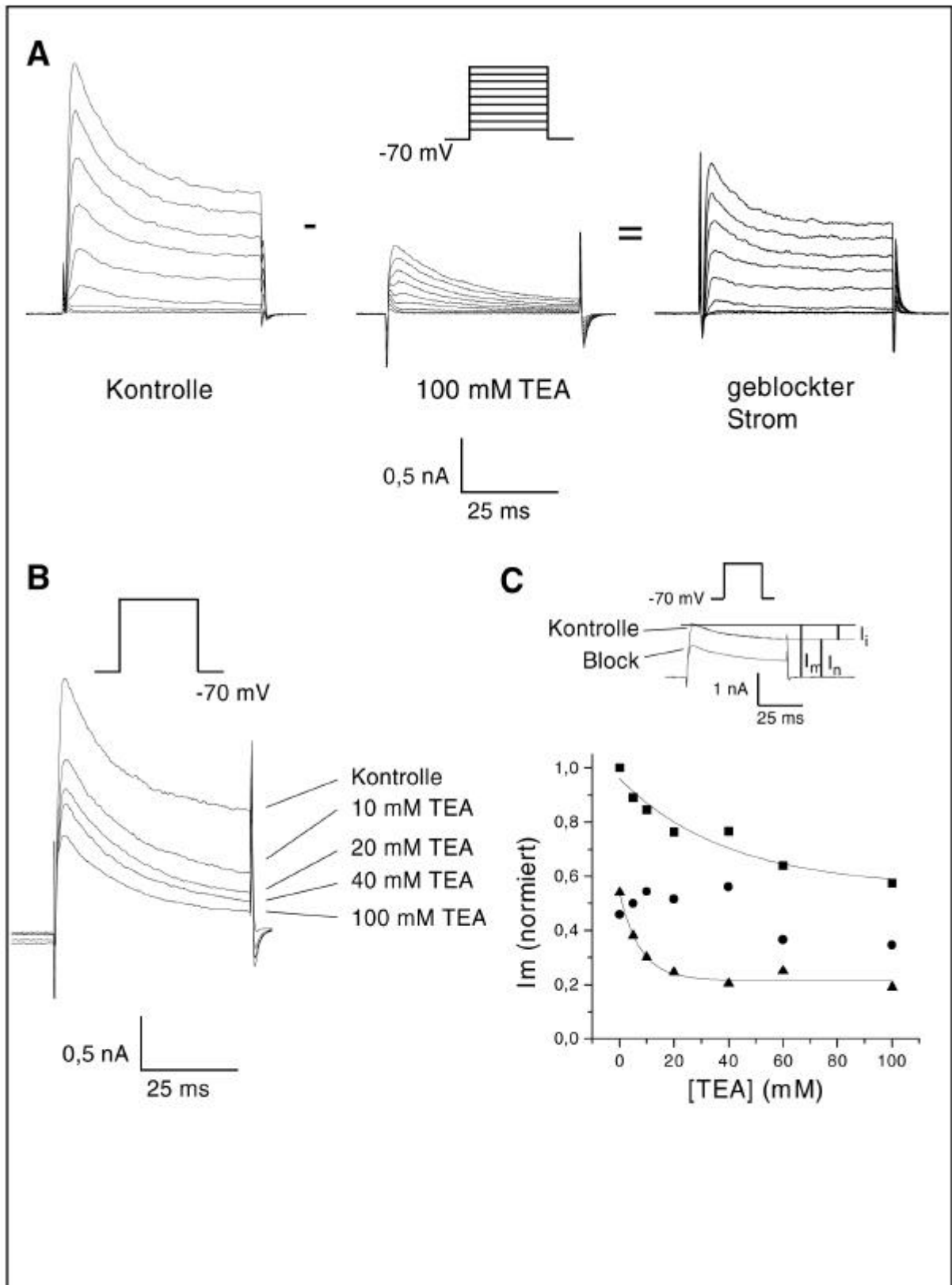


Abbildung 11
Block der K^+ Auswärtsströme durch Tetraethylammonium (TEA)

Auswärts rektifizierende Kaliumströme wurden in der Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-Technik durch depolarisierende Spannungssprünge (-60 mV bis +20 mV, s. Inset) bei Vorhandensein von 100 mM TEA sowie in Abwesenheit des Blockers aktiviert. Durch Differenzbildung kann der geblockte Stromanteil dargestellt werden. Wie in A) dargestellt, werden durch 100 mM TEA die nicht inaktivierenden Ströme vollständig inhibiert.

Membranströme bei Depolarisierung der Membran auf +20 mV bei verschiedenen TEA-Konzentrationen (10 bis 100 mM) (B).

Dosis-Wirkungs-Kurve für den Gesamtstrom (Peak-Strom), den inaktivierenden und den nicht inaktivierenden Stromanteil (s. Abb. 11 C, Inset). Während der inaktivierende Anteil keine signifikanten Änderungen aufweist, wird der nicht inaktivierende Anteil mit zunehmenden TEA-Konzentrationen gehemmt (C).

Durch 4-Aminopyridin (4-AP, 0,125-1 mM) dagegen wurde vorwiegend der inaktivierende Stromanteil gehemmt (s. Abb. 12). K^+ -Auswärtsströme wurden durch eine Serie von depolarisierenden Spannungssprüngen (-70 mV bis +20 mV) aktiviert. Die extrazelluläre Zugabe von 1 mM 4-AP führte zum Block von 55,5 % des bei einem Spannungssprung auf +20 mV aktivierten Peak-Stromes. Die Anteile von inaktivierenden und nicht inaktivierenden Strömen wurden wie oben errechnet. Während bei Anwesenheit von 1 mM 4-AP und einer Depolarisation auf +20 mV der inaktivierende Strom um 72,8 % des Kontrollstromes gehemmt wurde, betrug der Block des nicht inaktivierenden Anteils lediglich 18,7 %. Die halbmaximale Dosis wurde wie oben beschrieben aus der Dosis-Wirkungskurve des Gesamtstromes (I_p , Peakstrom) berechnet und betrug für den Block durch 4-AP $IC_{50} = 190 \mu M$.

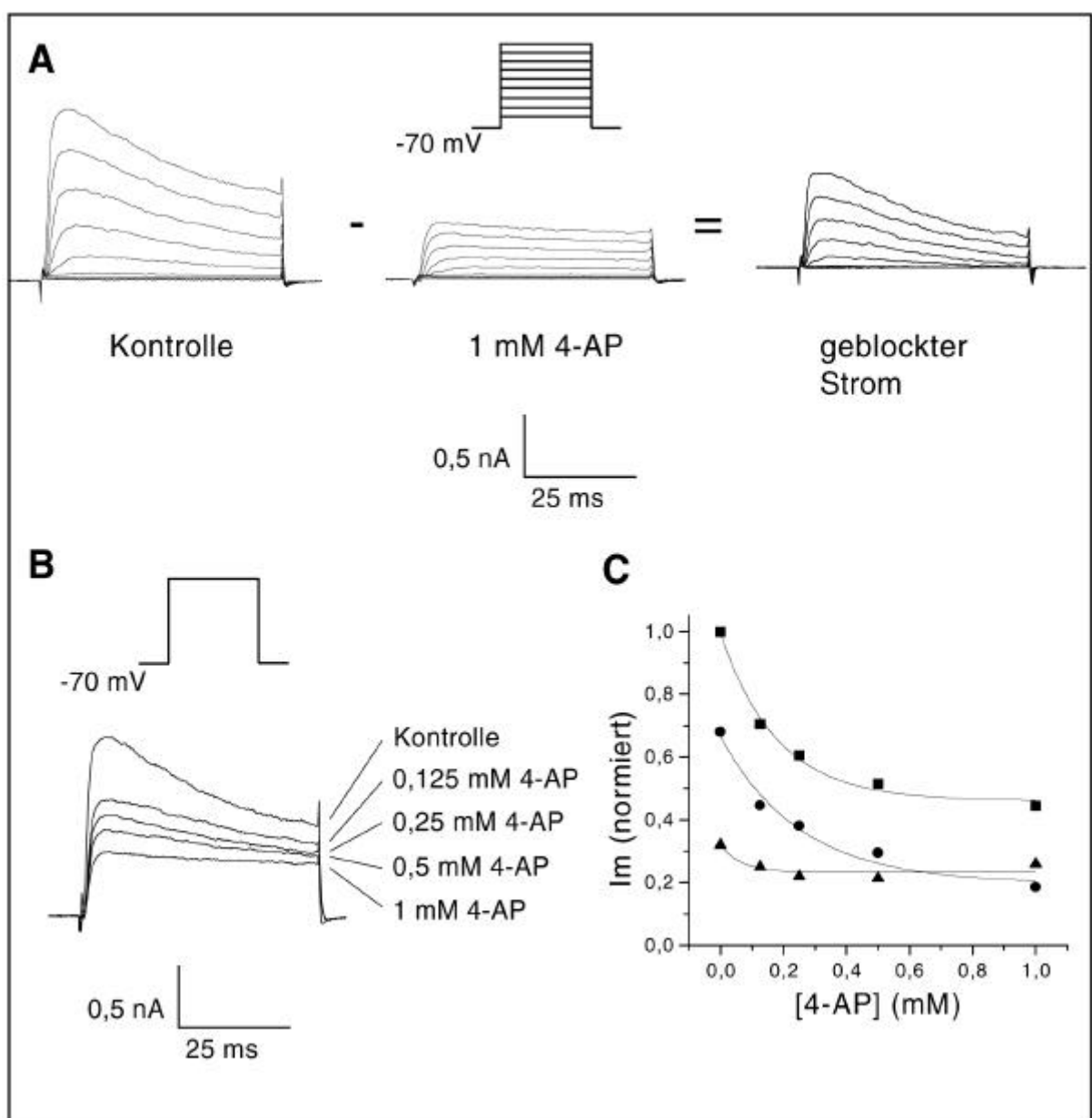


Abbildung 12
Block der Auswärtsströme von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen durch 4-Aminopyridin (4-AP)
A) Auswärts rektifizierende Kaliumströme wurden in der Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-

Technik durch depolarisierende Spannungssprünge (-60 mV bis +20 mV, s. Inset) bei Vorhandensein von 1 mM 4-AP in der Badlösung sowie in Abwesenheit des Blockers aktiviert. Durch Differenzbildung kann der geblockte Stromanteil dargestellt werden. Wie unter A) dargestellt, werden durch 1 mM 4-AP die inaktivierenden Ströme (vollständig) inhibiert.

- B) Membranströme bei Depolarisierung der Membran auf +20 mV bei verschiedenen 4-AP-Konzentrationen (0,125 bis 1 mM).
- C) Dosis-Wirkungs-Kurve für den Gesamtstrom(Peak-Strom), den inaktivierenden und den nicht inaktivierenden Stromanteil. Während der nicht inaktivierende Anteil keine signifikanten Änderungen aufweist, wird der inaktivierende Anteil mit zunehmenden 4-AP-Konzentrationen zunehmend gehemmt.

Der Gesamtzellstrom der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen besteht aus zwei Komponenten mit unterschiedlichen Inaktivierungseigenschaften (s. Abb. 10 FXX). Diese Stromanteile wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber den Kaliumkanalblockern TEA und 4-AP verglichen. Dazu wurde der nach einem depolarisierenden Vorpuls (-30 mV für 300 ms) durch einen Testpuls auf +20 mV aktivierte Stromanteil hinsichtlich seiner Sensitivität mit dem Gesamtstrom (unter Standardbedingungen, ohne Vorpuls) verglichen. Die halbmaximalen Blockerkonzentrationen wurden wie oben beschrieben aus der Dosis-Wirkungskurve ermittelt. Während der Gesamtzellstrom durch TEA mit einer halbmaximalen Konzentration von 29 mM geblockt wird, beträgt die IC_{50} für den bei einem Potential von $V_{1/2} = -12$ mV inaktivierenden Strom 1,2 mM (s. Abb. 12 C). Ebenso zeigten beide Stromkomponenten Unterschiede hinsichtlich der 4-AP-Sensitivität mit einer IC_{50} von 26 μ M für den bei -12 mV inaktivierenden Strom im Vergleich zu einer IC_{50} von 190 μ M für den Gesamtzellstrom. Die bei $V_{1/2} = -12$ mV inaktivierende Stromkomponente ist also durch eine sehr viel höhere Sensitivität für die Kaliumkanalblocker TEA (24-fach) und 4-AP (7-fach) gekennzeichnet.

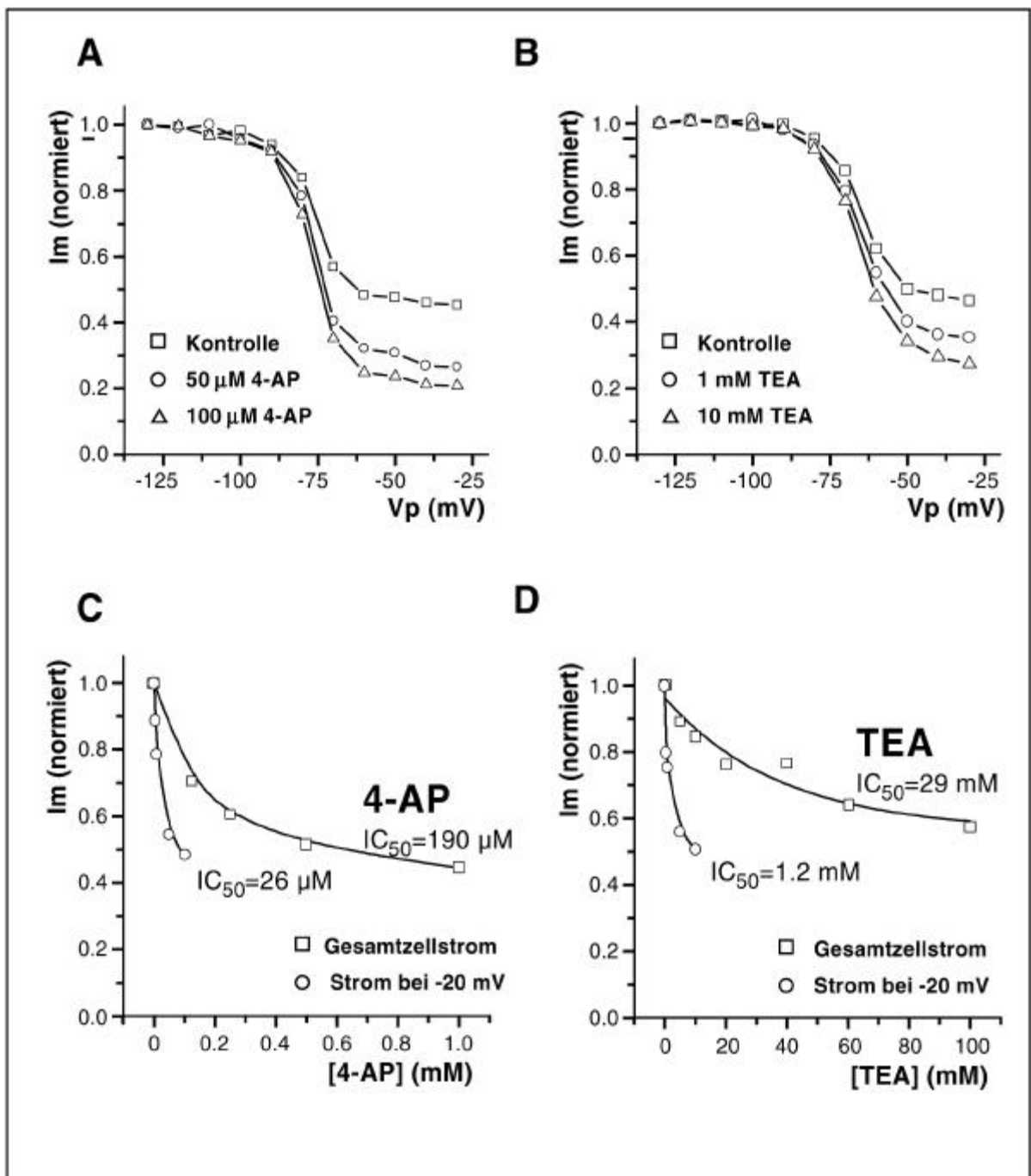


Abbildung 13

Geringe Konzentrationen von TEA und 4-AP hemmen eine Teilkomponente des Stromes

Die Zellmembran von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurde im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik auf unterschiedliche Vorpuls-Potentiale (-130 mV bis +10 mV für 300 ms) geklemmt und der danach bei $V_m = +20$ mV aktivierbare Strom gemessen. Dieser zeigt in Abhängigkeit vom Vorpuls-Potential einen biphasischen Verlauf mit einer bei ca. -60 mV bzw. bei ca. -12 mV inaktivierenden Komponente (A, B).

Die Dosis-Wirkungs-Kurve des Gesamtstroms (Quadrat) sowie der bei stark depolarisierenden Potentialen inaktivierenden Komponente (Kreis) sind in C) für 4-AP sowie in D) für TEA aufgetragen.

Die Toxine Charybdotoxin (CTX) und α -Dendrotoxin (DTX), sowie MCDP (mast cell degranulating peptide) stellen in verschiedenen Expressionssystemen wirksame Blocker für einige homomere Kv1-Kanäle (insbesondere Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 und Kv1.6) (Grissmer et al., 1994; Stühmer et al., 1989, Übersicht s. Chandy und Gutman, 1995) dar. Bei Anwendung dieser Substanzen in den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden die Kaliumströme jedoch nicht signifikant gehemmt. Die

Membranströme, hervorgerufen durch einen depolarisierenden Spannungssprung auf +20 mV, wurden in Gegenwart des Blockers sowie (davor und danach) in Standardbadlösung gemessen. Bei Zugabe von 1 μM Charybdotoxin wurden noch 96 % (± 5 %, $n=3$) des Kontrollstromwertes gemessen, in der Gegenwart von 2 μM α -Dendrotoxin 92 % (± 10 %, $n=3$) und bei Zugabe von 4 μM MCDP 94 % (± 8 %, $n=4$). Die Funktionalität der Blocker wurde in Kontrollexperimenten an C6-Astrozytoma-Zellen nachgewiesen.

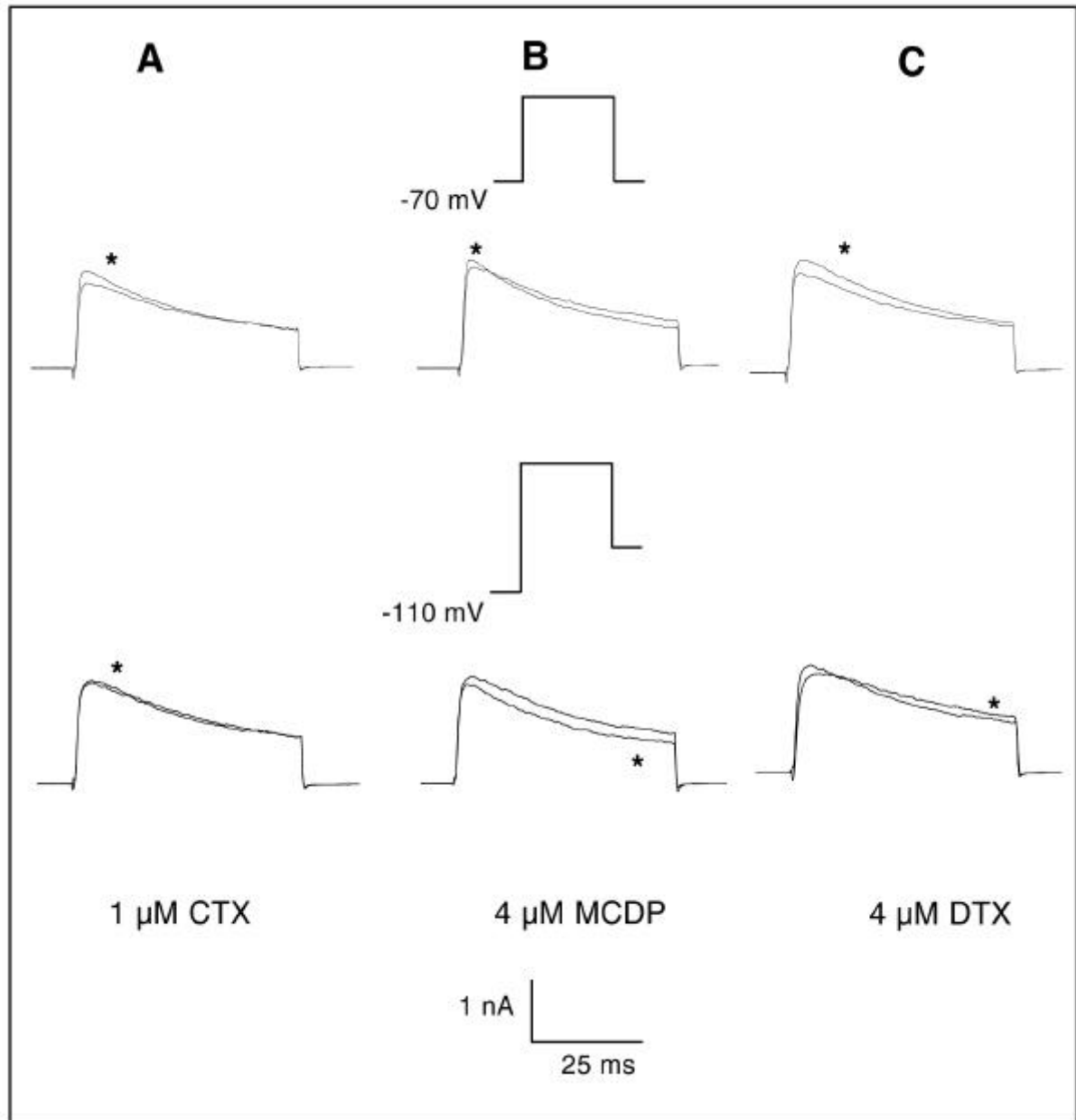


Abbildung 14

Blockierbarkeit der K^+ Ströme durch α -Dendrotoxin (DTX), Charybdotoxin (CTX) und MCDP (mast cell degranulating peptide)

Die Applikation von CTX (1 μM) (A), DTX (2 μM) (B) sowie MCDP (4 μM) (C) führte zu keiner signifikanten Reduktion der Auswärtsströme. Die Ströme wurden durch jeweils einen Spannungssprung für 50 ms vom Haltepotential von -70 mV zu einem Potential von +20 mV in Anwesenheit (*) sowie in Abwesenheit des Blockers aktiviert.

Die Verwendung des K^+ -Kanalblockers Chinidin (5 μM bis 100 μM) (spezifisch für Kanäle der Kv1 (Grissmer et al., 1994; Fedida, 1997) und Kv3 Familien (Grissmer et al., 1994; Rettig et al., 1992)) führte zur weitgehenden Blockierung der Auswärtsströme an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. In Anwesenheit von 100 μM Chinidin inaktivierten die durch depolarisierende Spannungspulse (-70 mV

bis +90 mV) hervorgerufenen Ströme innerhalb von 50 ms nahezu vollständig (4-7A), in Kontrollexperimenten in Standardbadlösung dagegen wurde unter den selben Bedingungen lediglich eine Inaktivierung von 35 % (± 17 %, n=27) des Gesamtstromes beobachtet. Bei Anwesenheit von 100 μ M Chinidin wurden 56,8 % ($\pm 15,4$ %, n=6) des Peakstromes bei +20 mV sowie 76,5 % ($\pm 8,5$ %, n=6) des Stromes am Ende eines 50 ms Pulses auf +20 mV gehemmt. Die halbmaximale Blockerkonzentration beträgt 16,6 μ M für den Strom am Ende eines 50 ms Pulses auf +20 mV sowie 36,13 μ M für den Peakstrom bei +20 mV. Durch Anpassen einer fallenden Exponentialfunktion an die Stromspur erhält man die für die Inaktivierung charakteristische Zeitkonstante. Mit zunehmender Chinidinkonzentration fällt diese Zeitkonstante von $34,2 \pm 4,2$ ms unter Kontrollbedingungen (n=10) auf $4,9 \pm 1,3$ ms bei 100 μ M Chinidin. Dies entspricht einer Reduktion auf 12,3 % des Kontrollwertes bei Anwesenheit von 100 μ M Chinidin.

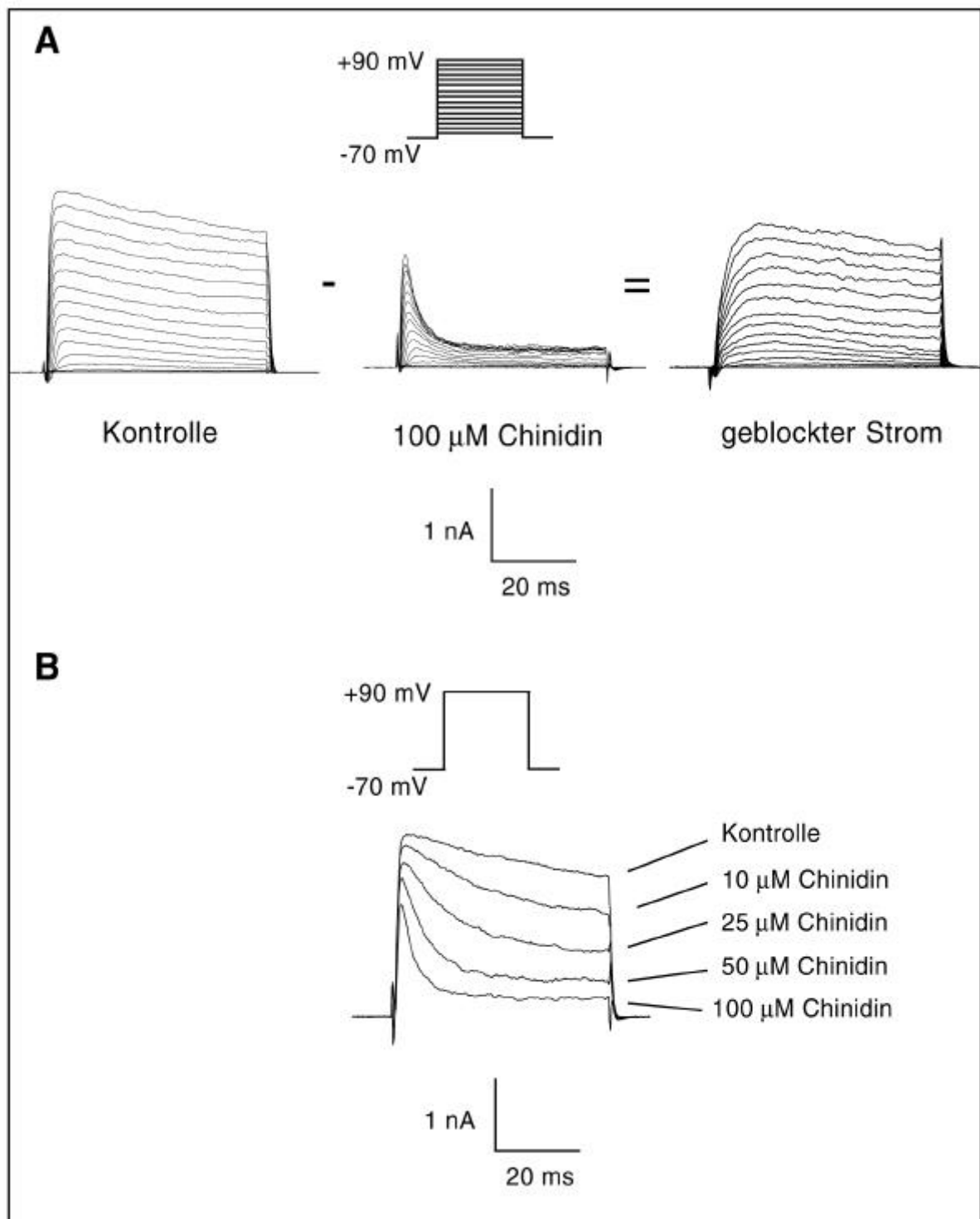


Abbildung 15
Block der Auswärtsströme von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen durch Chinidin

- A) Auswärts rektifizierende Kaliumströme wurden in der Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-Technik durch depolarisierende Spannungssprünge (-60 mV bis +90 mV, s. Inset) bei Vorhandensein von 100 μ M Chinidin in der Badlösung sowie in Abwesenheit des Blockers aktiviert (A). In Anwesenheit des Blockers ist die Inaktivierung der Ströme stark beschleunigt. Durch Differenzbildung kann der geblockte Stromanteil dargestellt werden.
- B) Membranströme bei Depolarisierung der Membran auf +20 mV bei verschiedenen Chinidin-Konzentrationen (bis 100 μ M) (B).

Während die spezifischen Toxine DTX, CTX sowie MCDP keinen Einfluß auf die Kaliumkanalaktivität

von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen haben, zeigten Chinidin sowie TEA und 4-AP in relativ hoher Konzentration einen blockierenden Effekt. Während TEA die nicht inaktivierenden Stromanteile blockiert, werden durch 4-AP die inaktivierenden Ströme gehemmt. Es konnte gezeigt werden, daß ein Teil des Stromes, der sich durch eine höhere halbmaximale Inaktivierungsspannung auszeichnet, eine sehr viel höhere Sensitivität gegenüber 4-AP und TEA besitzt.

4.1.4 Expression von Kv1 Proteinen

Die Expression einer Gruppe von Kaliumkanälen des "delayed rectifier-" Typs auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurde durch immunozytochemische Färbungen mit der ABC-DAB-Technik untersucht. Dazu wurden auf einem Monolayer von Astrozyten ausplattierte Oligodendrozytenvorläuferzellen mit speziell gegen die Kaliumkanalproteine Kv1.1 bis Kv1.6 gerichteten polyklonalen Antikörpern gefärbt (Kv1.2, Kv1.4 und Kv1.5; Alomone Labs, Israel und Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 und Kv1.6 beschrieben in: Veh et al., 1995).

Es zeigte sich, daß bei der Mehrzahl der Vorläuferzellen die Kanalmoleküle Kv1.4 (85 % der Zellen, n=525, N=2), Kv1.5 (99 % der Zellen, n=635, N=1) und Kv1.6 (99 % der Zellen, n=1055, N=3) exprimiert werden. Kv1.1 dagegen wurde nur von einem geringen Prozentsatz der Zellen (10 %, n=1835, N=5) exprimiert. Die K^+ Kanalmoleküle Kv1.2 und Kv1.3 konnten auf diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurden als Positivkontrolle Schnitte vom Kleinhirn der Maus parallel angefärbt. Diese zeigten die bei Veh et al., 1995 beschriebenen Färbemuster (s. Abb. 19).

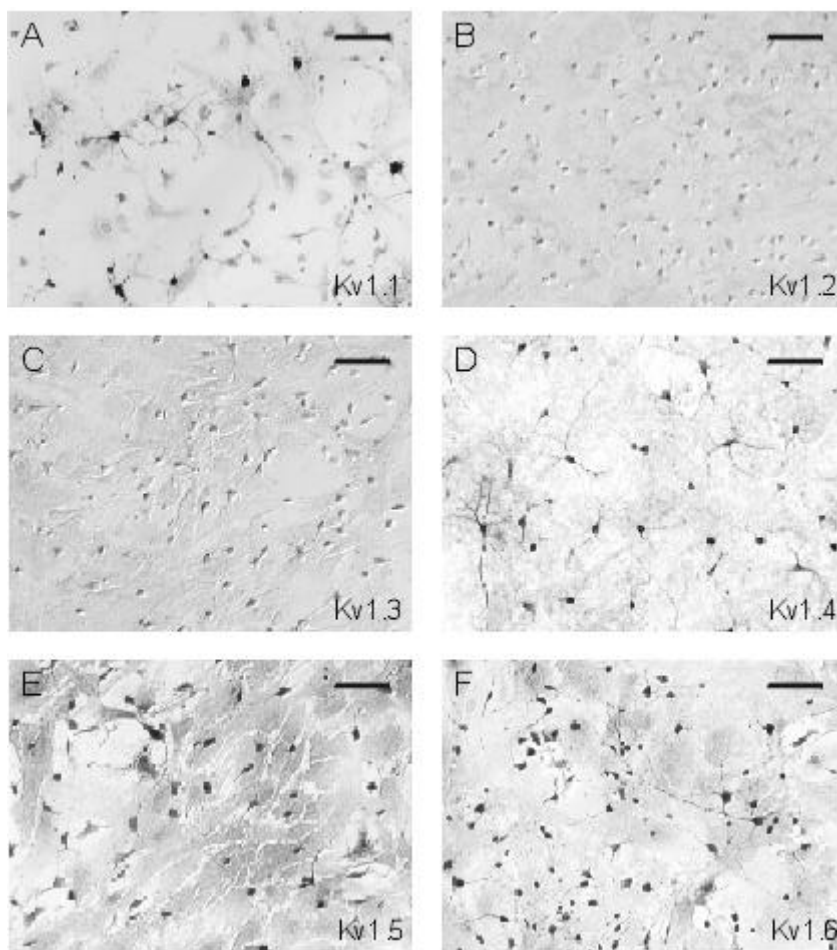


Abbildung 16
Expression der Kv1 Kaliumkanalmoleküle in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Maus

Oligodendrozytenvorläuferzellen der Maus wurden auf einen Astrozytenmonolayer ausplattiert und mit spezifischen Antikörpern gegen die Kanalmoleküle Kv1.1 (A), Kv1.2 (B), Kv1.3 (C), Kv1.4 (D), Kv1.5 (E) und Kv1.6 (F) mit der ABC-DAB-(Avidin-Biotin-Peroxidase-) Technik (s. Material und Methoden) immunozytochemisch gefärbt.

Während die Mehrzahl der Zellen Kv1.4, Kv1.5 sowie Kv1.6 exprimierten, wurde Kv1.1 nur in ca. 10 % der Zellen gefunden. Kv1.2 und Kv1.3 Kanäle konnten nicht gefunden werden. Der Balken entspricht 50 μm .

Kv1.1-Kanalmoleküle wurden sowohl auf unreifen Vorläuferzellen mit 2-3 Ausläufern als auch auf reiferen Zellen mit zahlreichen, weitverzweigten Ausläufern gefunden. Auf diesen Zellen befindet sich das Protein gleichmäßig sowohl auf dem Zellkörper als auch auf den Ausläufern. Besonders stark sind die Wachstumskegel/Verzweigungspunkte der Ausläufer gefärbt. Der Astrozyten-Monolayer zeigt keine Kv1.1-Färbung.

Die Mehrzahl der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, jedoch keine Astrozyten, zeigen eine positive Kv1.4-Färbung. Kv1.4 Proteine befinden sich auf den Zellen auf dem Soma und hauptsächlich auf einigen Ausläufern (häufig nur einem besonders langen Ausläufer). Dünnere und verzweigtere Ausläufer wurden nicht oder nur schwach angefärbt (Abb. 17).

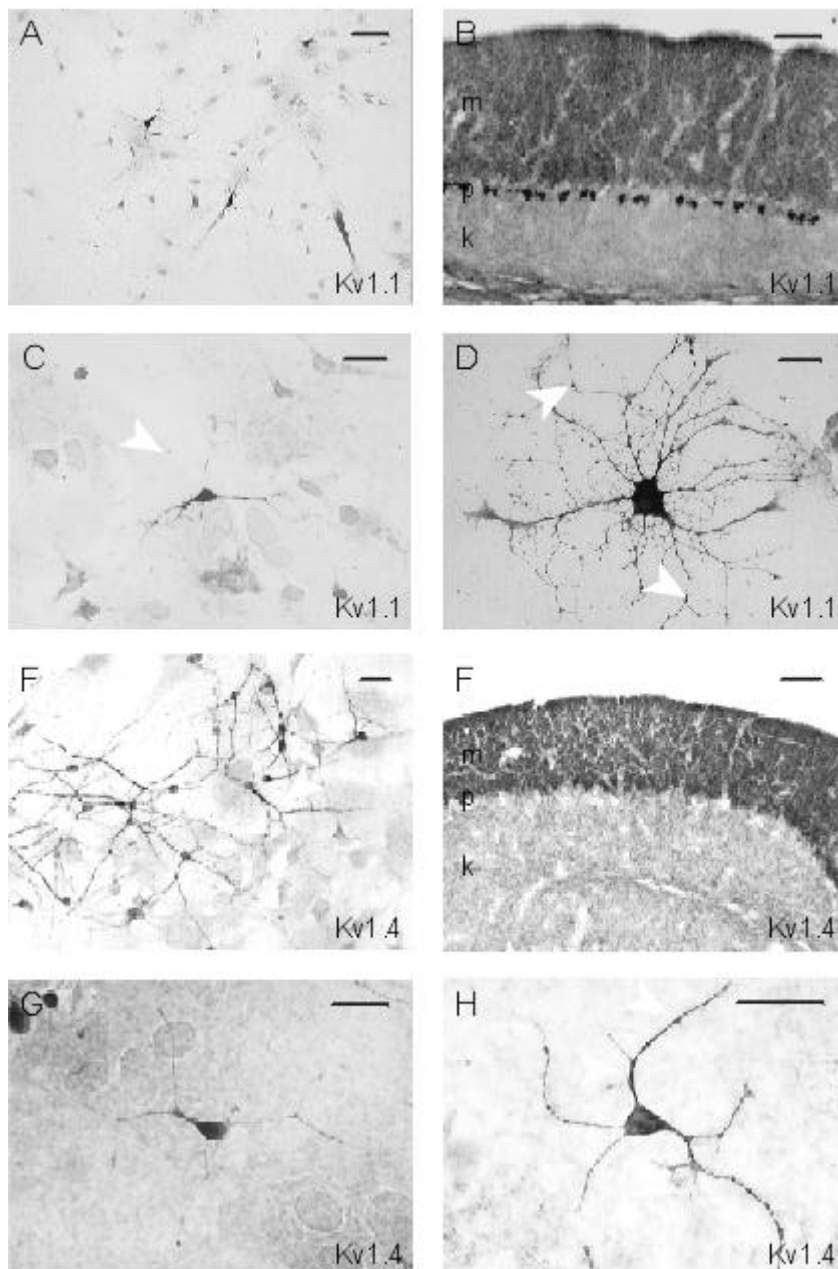


Abbildung 17
Lokalisation von Kv1.1 und Kv1.4 K^+ Kanalmolekülen auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden auf einem Monolayer von Astrozyten ausplattiert und mit Kv1.1 bzw. Kv1.4 spezifischen polyklonalen Antikörpern immunozytochemisch gefärbt. Die Färbung wurde mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Technik (s. Material und Methoden, Kap. 3.3.b) dargestellt.

Ein Teil der Vorläuferzellen (10 %), jedoch keine Astrozyten exprimierten Kv1.1 (A). Eine Expression von Kv1.1 wurde sowohl bei bipolaren Vorläuferzellen (C), als auch bei größeren und weiter verzweigten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (D) gefunden. Eine besonders starke Färbung zeigten die Wachstumskegel sowie die Verzweigungspunkte der Ausläufer (Pfeile).

Ein relativ großer Anteil der Oligodendrozyten (85 %) zeigte eine positive Färbung mit dem Kv1.4 spezifischen Antikörper (F). Dabei wurde häufig ein Ausläufer (Hauptausläufer) besonders stark angefärbt. Bei höherer Vergrößerung wird auch hier eine besondere Färbung der Wachstumskegel und Verzweigungspunkte sichtbar (G, H). Als Positivkontrolle wurden jeweils Schnitte vom Kleinhirn der Maus verwendet (B, F). Der Balken entspricht 50 μm (A, B, E, F) bzw. 20 μm (C, D, G, H).

Kv1.5 wurde nicht nur in der überwiegenden Mehrzahl der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, sondern auch auf Zellen des darunterliegenden Astrozytenrasen gefunden. Die relativ stark punktierte Färbung läßt die Bildung von Kanalaggregaten vermuten. In Astrozyten wurde ebenfalls ein punktiertes Färbemuster festgestellt (Abb. 18 C).

Kv1.6-Proteine wurden in so gut wie allen Zellen der Oligodendrozyten-Abstammung gefunden (99% der Zellen). Dabei wurden sowohl Vorläuferzellen mit wenigen Ausläufern als auch Vorläuferzellen mit komplexerer Morphologie auf Soma und Ausläufern gefärbt (Abb. 18 E-H).

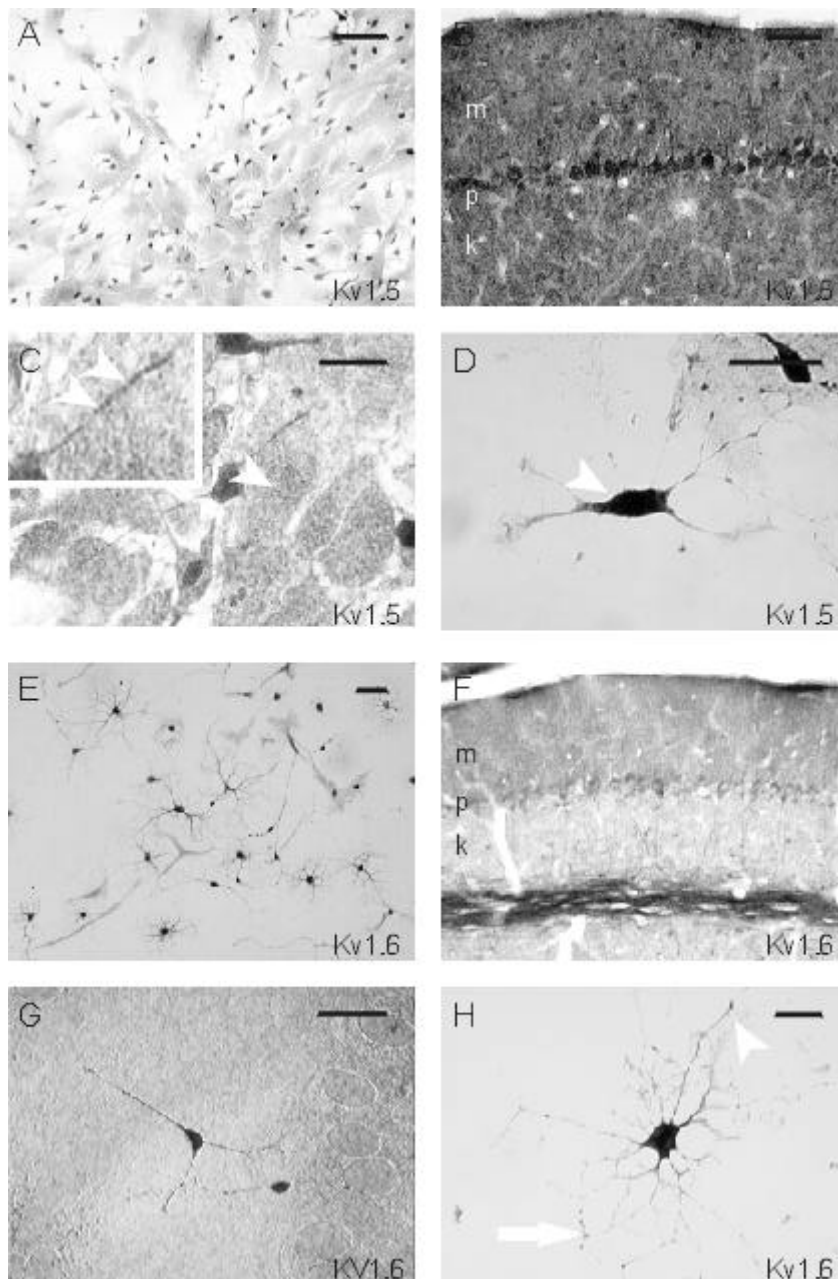


Abbildung 18
Lokalisation von Kv1.5 und Kv1.6 K⁺ Kanalmolekülen auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
 Auf einem Monolayer von Astrozyten ausplattierte gliale Vorläuferzellen wurden mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Technik mit Kv1.5 bzw. Kv1.6 spezifischen polyklonalen Antikörpern gefärbt.

Sowohl alle Oligodendrozyten-Vorläuferzellen als auch der darunterliegende Astrozytenrasen exprimieren das Kv1.5 Protein (A). Die punktierte Färbung deutet auf eine punktförmige Anhäufung von Kanalmolekülen in der Membran (Klusterbildung) der Kv1.5 Proteine hin (C, D). An den Zellkörpern ist eine sehr viel stärkere Färbung als an den Ausläufern zu erkennen.

Die überwiegende Mehrheit der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, jedoch keine Astrozyten exprimierten das Kv1.6 Protein (E). Dabei zeigten sowohl die bipolaren Vorläuferzellen als auch die Vorläuferzellen mit komplexerer Morphologie und zahlreichen Ausläufern eine positive Färbung.

Als Positivkontrolle wurden jeweils Schnitte von Maus Kleinhirn verwendet (B, F). Balken entspricht 20 µm (D, G, H) bzw. 50 µm (A, B, C, E, F).

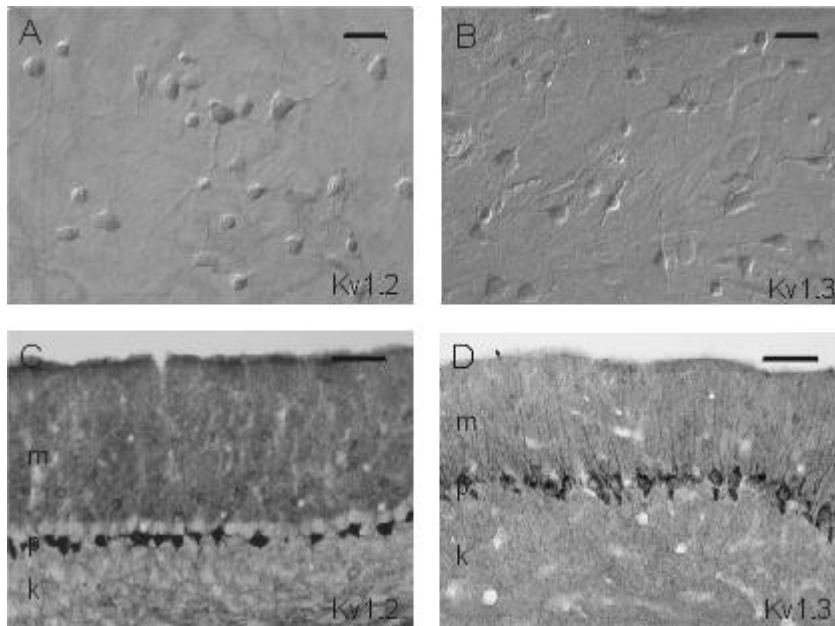


Abbildung 19

Keine Expression von Kv1.2 und Kv1.3 Proteinen auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Auf einem Monolayer von Astrozyten ausplattierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden mit der Avidin-Biotin-Technik auf das Vorhandensein von Kv1.2 und Kv1.3 Proteinen getestet.

- A) Kultivierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimieren kein Kv1.2 Protein.
- B) Kultivierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimieren kein Kv1.3 Protein.
- C) Als Positivkontrolle wurden Maus-Kleinhirnschnitte verwendet. Die Kv1.2-Färbung zeigt das bei Veh et al., 1995 beschriebene Färbemuster. Es wurden spezifisch Zellen aus der Purkinje-Zellschicht sowie die Molekularschicht (m) angefärbt.
- D) Die Kv1.3-Färbung des als Positivkontrolle verwendeten Kleinhirnschnitts zeigt das in der Literatur beschriebene Färbemuster. Es sind vor allem die Zellkörper der Purkinje-Zellen sowie deren Ausläufer gefärbt.

Der Balken entspricht 20 μm (A, B) bzw. 50 μm (C, D). (m- Molekularschicht, p- Purkinje- Zellschicht, k- Körnerzellschicht)

Kultivierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimieren mehrere Proteine aus der Kv1-Familie der spannungsaktivierten K^+ Kanäle gleichzeitig. Während manche Proteine (insbesondere Kv1.6) mehr oder weniger homogen über die Zelloberfläche verteilt sind, kommen andere Kv1 Proteine (Kv1.4, Kv1.1) verstärkt in bestimmten Bereichen (wie Ausläufer, Wachstumskegel) vor.

4.1.5 Expression von Kv1 Transkripten

In Kombination mit einer elektrophysiologischen Untersuchung im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik wurde das Zytoplasma von insgesamt 17 Zellen geerntet und auf das Vorhandensein von Kv1 spezifischen Transkripten (mRNA) untersucht.

Durch die Benutzung von degenerierten Primern war es möglich, alle Kv1 spezifischen Transkripte (Kv1.1 bis Kv1.6) in einer Zelle gleichzeitig nachzuweisen. Die amplifizierten Fragmente unterscheiden sich in ihrer Länge (Abb. 20 A). Die Auftrennung in einem Agarosegel zeigt zwar das Vorhandensein von Fragmenten unterschiedlicher Länge, ergibt aber keine genügende Auftrennung (Abb. 20 B). Für eine weitere Auftrennung wurden die PCR-Produkte durch die Verwendung von fluorescein-gekoppelten Primern fluoreszenzmarkiert und anschließend mit einem automatischen Kapillarsequenzierer aufgetrennt.

Die Messungen ergaben, daß die meisten Zellen mehrere (2-3) Kv1 Transkripte gleichzeitig exprimieren. Bei 4 (von 17) Zellen) konnte nur ein Kv1 Transkript nachgewiesen werden. Die exprimierten Transkripte waren am häufigsten Kv1.2 (64,7 % der Zellen), Kv1.6 (58,8%), Kv1.5 (52,9 %), Kv1.3 (29,4 %), Kv1.4 (23,5 %) sowie. Kv1.1 (5,9 %).

Die relativen Anteile der einzelnen Zellen an Kv1 spezifischen Transkripten sind in Tabelle 1 dargestellt.

#	Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3	Kv1.4	Kv1.5	Kv1.6
226/2						100
234/1					13	87
234/10		13	3		2	81
234/2				27	25	48
226/4		29		46		25
226/1		76				24
226/7		36			48	17
234/7		75			9	16
226/6					90	10
226/5		86	5		6	4
226/8		100				
234/6		100				
234/4			100			
226/10	40				60	
234/11		27	73			
226/9		80		6	15	
234/3		56	39	6		
#	1/17	11/17	5/17	4/17	9/17	10/17
%	5.9	64.7	29.4	23.5	52.9	58.8

Tabelle 2
Anteile von Kv1 Transkripten in einzelnen Oligodendrozytenvorläuferzellen

Erstaunlicherweise wurde das Kv1.2 Transkript in einem großen Teil der Zellen (64,7 % der Zellen) und Kv1.3 in 29,4 % der Zellen gefunden, obwohl die Expression der entsprechenden Proteine mit den immunozytochemischen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte. Trotz der sehr heterogenen Transkriptexpression konnten bei den untersuchten Zellen keine Unterschiede hinsichtlich des Strommusters festgestellt werden (Abb. 21).

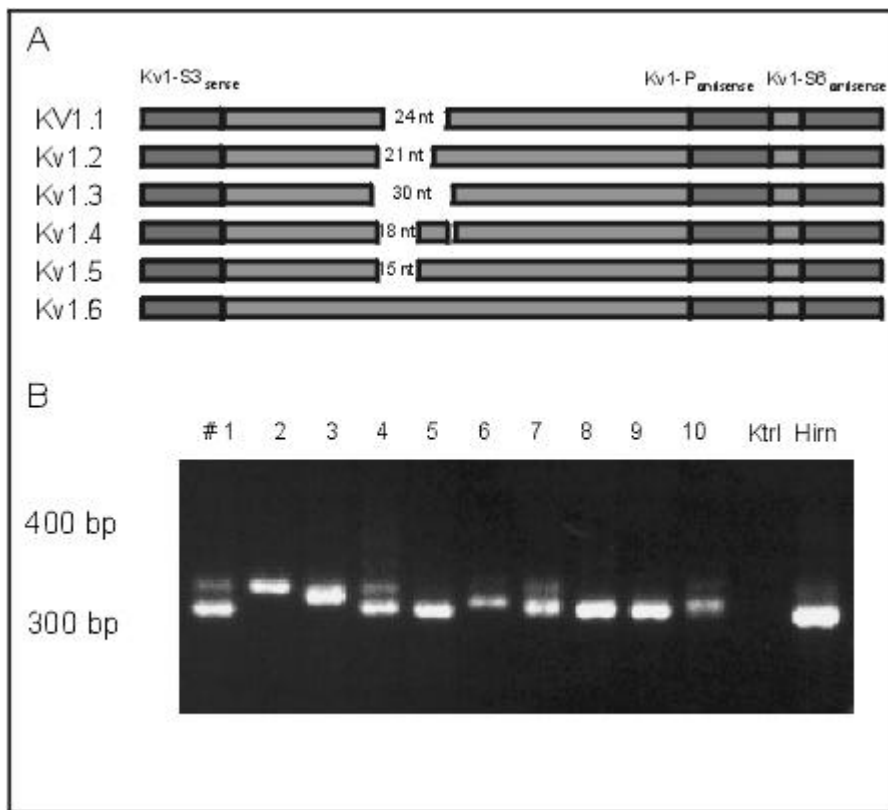


Abbildung 20
Analyse der Kv1-Transkriptexpression mit Hilfe der Einzelzell-PCR-Technik

- A) Bei der Einzelzell-PCR können durch die Nutzung von degenerierten Primern die amplifizierten cDNA-Fragmente aufgrund ihrer Länge unterschieden werden. Die PCR wurde zuerst mit dem Primerpaar Kv1-S6_{antisense} und Kv-S3_{sense} und danach mit dem Primerpaar Kv1-P_{antisense} und Kv1-S3_{sense} durchgeführt (seminested).
- B) Die cDNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar visualisiert.

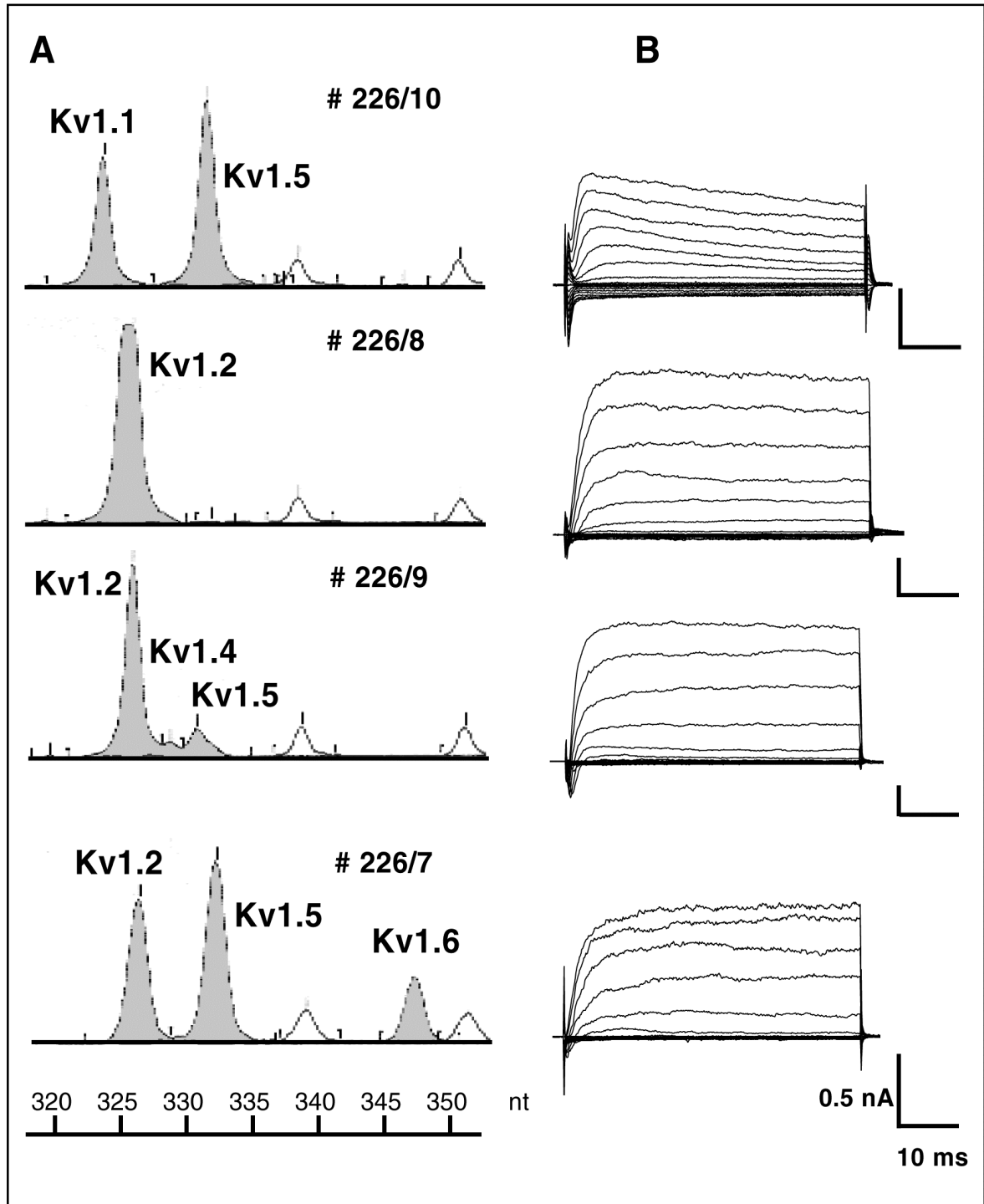


Abbildung 21
Kv1 Transkriptexpression und Ganzzellstrommuster von einzelnen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

A) Die Auftrennung der amplifizierten cDNA-Fragmente erfolgte durch Kapillarelektrophorese. Durch die Nutzung von Molekulargewichtsmarkern (rot) kann die Fragmentlänge auf ein Basenpaar genau bestimmt werden. Kv1-Transkripte treten in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in sehr unterschiedlichen Kombinationen auf. Zum Teil wurde nur ein Transkript pro Zelle gefunden (z.B. Zelle 8, zweite Spur von oben), meist jedoch zwei bis drei Transkripte (z.B. Zelle 10, oberste Spur).

- B) Vor dem Ernten des Zytoplasmas wurden die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Konfiguration elektrophysiologisch untersucht. Zur Aktivierung der K^+ Auswärtsströme wurden depolarisierende Spannungssprünge (-70 mV bis +20 mV) für 50 ms ausgeführt. Trotz der heterogenen Transkriptexpression konnten keine signifikanten Unterschiede im Strommuster der Zellen festgestellt werden.

4.1.6 Einfluß der Kv1.1 bzw. Kv1.4-Expression auf die elektrophysiologischen Eigenschaften

Um den Beitrag der einzelnen Kaliumkanäle zu den elektrophysiologischen Eigenschaften des Gesamtzellstromes zu testen, wurden einzelne Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zuerst elektrophysiologisch untersucht und danach auf das Vorhandensein der Kanalproteine Kv1.4 (n=9) bzw. Kv1.1 (n=18) getestet. Das Wiederfinden der Zellen wurde durch ein auf den Deckgläsern vorhandenes Beschriftungssystem ("cellocate-" Deckgläser, Fa. Eppendorf, Hamburg) ermöglicht. Im Anschluß wurden die Unterschiede hinsichtlich der Stromeigenschaften zwischen Kv1.4-positiven (n=5) und Kv1.4-negativen Zellen (n=4) bzw. zwischen Kv1.1-positiven (n=1) und Kv1.1-negativen Zellen (n=17) verglichen.

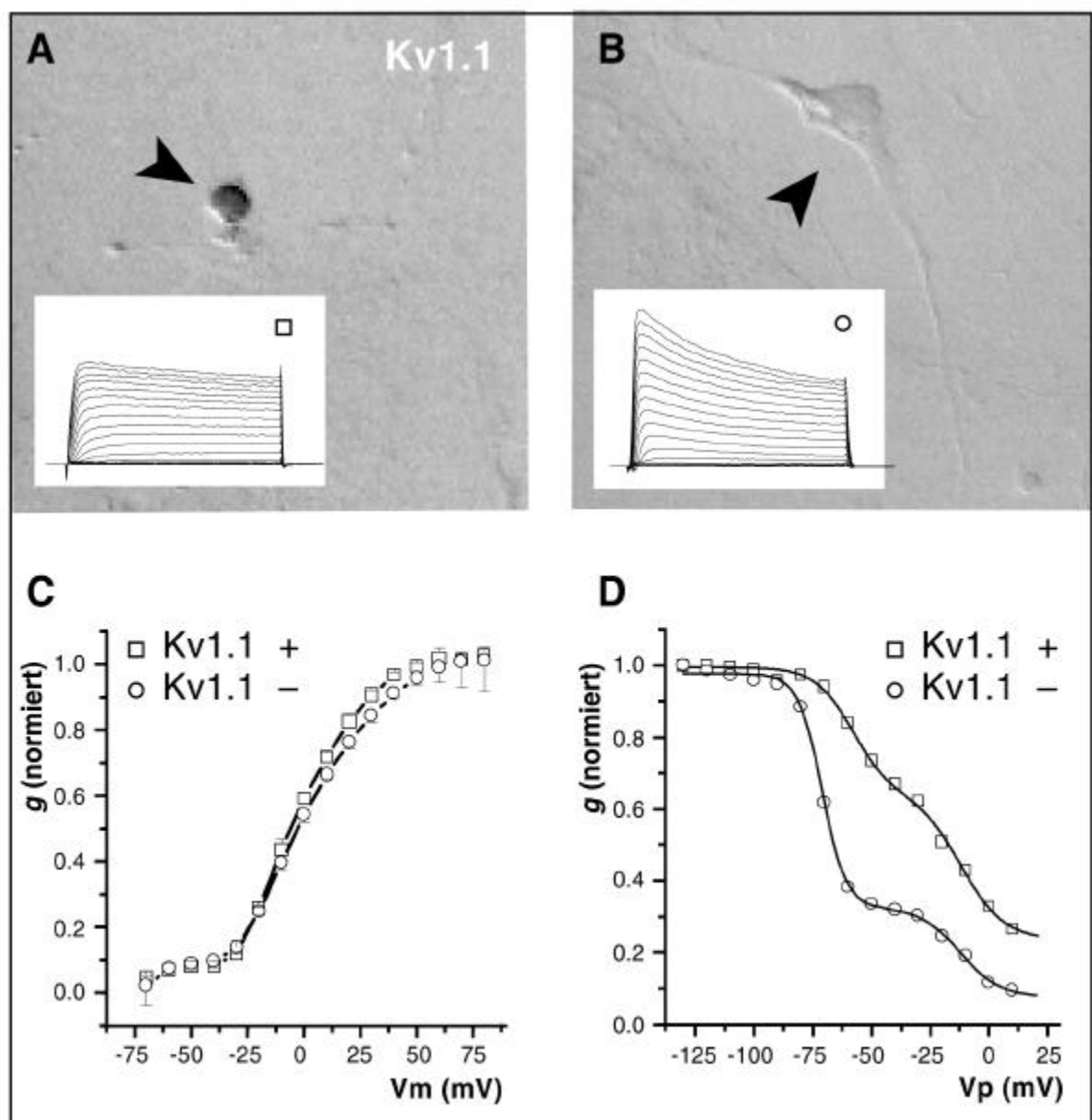


Abbildung 22
Elektrophysiologische Eigenschaften von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Vergleich zur Expression des Kv1.1-Proteins

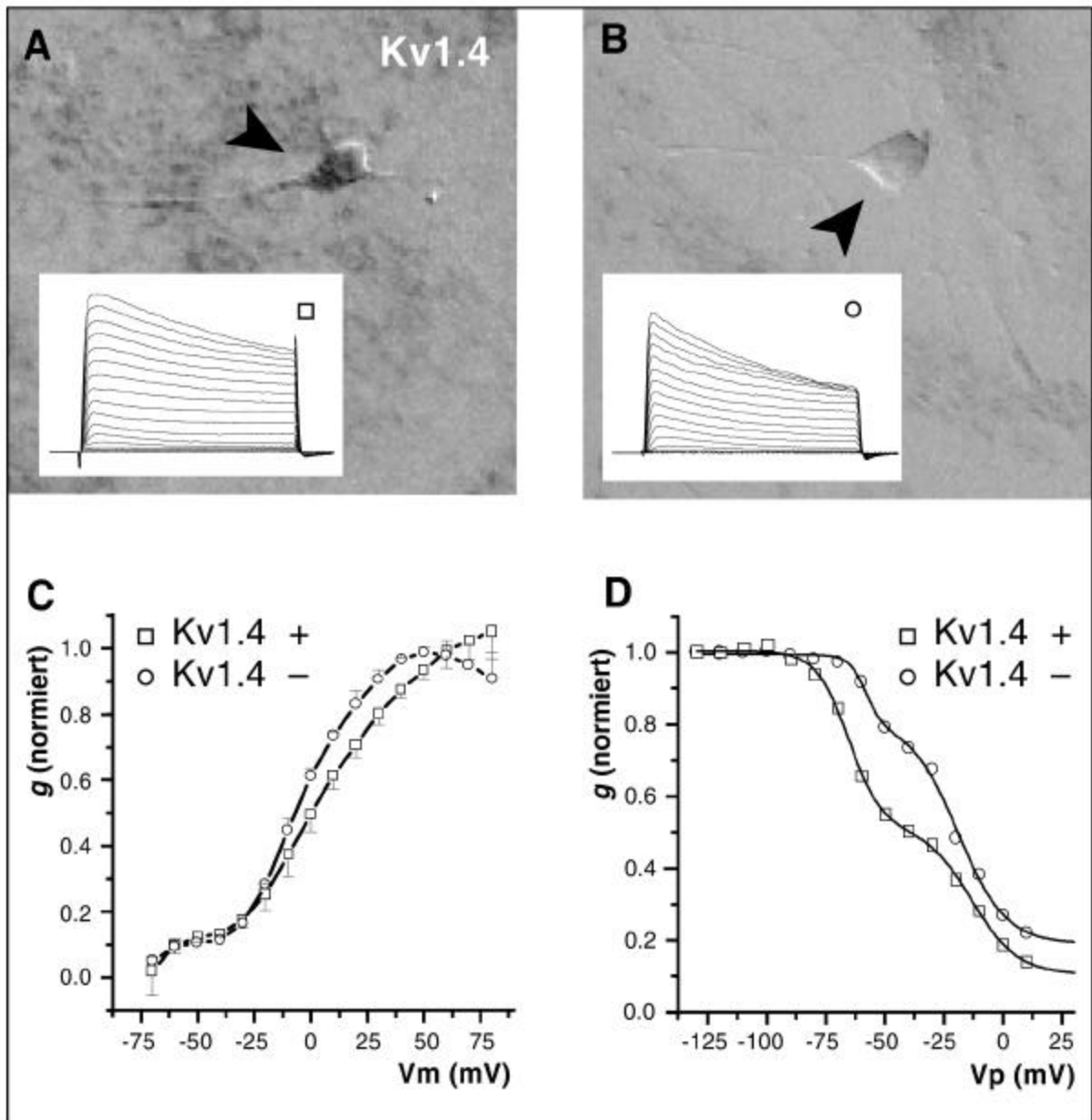
Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik untersucht und anschließend immunozytochemisch auf die Expression von Kv1.1 getestet.

- A) Kv1.1 positive Oligodendrozyten-Vorläuferzelle. K^+ Auswärtsströme wurden durch depolarisierende Spannungspulse (-70 bis +90 mV) aktiviert.
- B) Kv1.1 negative Oligodendrozyten-Vorläuferzelle. K^+ Auswärtsströme zeigen eine leichte zeitliche Inaktivierung.
- C) mittlere Strom-Spannungskurve von 11 Kv1.1 negativen Zellen (Kreis) und einer Kv1.1 (Quadrat) positiven Zelle. Es treten keine Unterschiede in der Stromaktivierung auf.
- D) Mit Hilfe eines Vorpuls-Stimulationsprotokolls (s. Material und Methoden, 3.2.4.4.) wurde die Inaktivierung der K^+ Ströme bei Kv1.1 negativen (Kreis) und Kv1.1 positiven (Quadrat) Zellen untersucht. Bei der Kv1.1 positiven Zelle ist der Anteil des zweiten, erst bei stärkerer Depolarisierung inaktivierenden Stromes größer (60 %) als bei der Kv1.1 negativen Zelle (34 %). Die halbmaximalen Inaktivierungsspannungen liegen innerhalb der Schwankungsbreite der Zellen.

Die Membranströme der kultivierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik im Ganzzellmodus untersucht. Das direkt nach dem Herstellen der Ganzzellkonfiguration unter Stromklemme gemessene Membranpotential lag für die Kv1.1 negativen Zellen mit $V_m = -47$ mV (± 10 mV, $n=17$) nahe dem Mittelwert für diese Zellen ($V_m = -53$ mV ± 16 mV; $n=176$). Das Membranpotential der Kv1.1 positiven Zelle lag mit -64 mV etwas weiter im negativen Bereich. Durch eine Serie von depolarisierenden Spannungspulsen (-70 mV bis +90 mV für 50 ms) wurden bei allen Zellen K^+ Auswärtsströme aktiviert. Die Stromwerte wurden entsprechend Gleichung 4-2 (s. oben) in Leitfähigkeiten umgerechnet und gegen die Spannung aufgetragen. Der Verlauf dieser Kurven war bei den Kv1.1 positiven und Kv1.1 negativen Zellen nahezu identisch (Abb. 22 C). Die Anpassung mit einer Boltzmann-Funktion ergab eine mittlere halbmaximale Aktivierungsspannung von $V_{1/2} = 0,9$ mV ($\pm 9,4$ mV, $n=15$) bei den Kv1.1 negativen Zellen sowie einen Wert von -2,8 bei der Kv1.1 positiven Zelle. Die Spannungsabhängigkeit der Kanalinaktivierung wurde mit Hilfe eines Vorpuls-Stimulationsprotokolls (Spannungssprungprotokoll 4, Abb. 7 D, Material und Methoden) untersucht. Die Auftragung der Leitfähigkeiten gegen das Membranpotential ergibt biphasisch sigmoid abnehmende Kurven (Abb. 22 D). Diese wurden durch eine Summe von zwei Boltzmannfunktionen angepaßt. Es ergaben sich keine Unterschiede der Kanalinaktivierung zwischen Kv1.1 positiven und Kv1.1 negativen Zellen. Die halbmaximale Inaktivierungsspannungen betrugen $V_{1/2} = -63,4$ ($\pm 5,5$; $n=4$) und $V_{1/2} = -15,7$ ($\pm 1,9$; $n=4$) für die Kv1.1 negativen Zellen und $V_{1/2} = -58$ mV bzw. $V_{1/2} = -11,9$ mV für die Kv1.1 positive Zelle.

Die relativen Anteile der beiden Stromfraktionen unterschieden sich bei Kv1.1 negativen und positiven Zellen. Während bei den Kv1.1 negativen Zellen 65 % (± 5 %, $n=4$) des Stromes durch die erste Boltzmannfunktion (mit $V_{1/2} = -60$ mV) angepasst werden konnten, waren es bei der Kv1.1 positiven Zelle lediglich 35 %. Diese Werte liegen aber im Bereich der Schwankungen innerhalb der Zellen.

Kombinierte elektrophysiologische und immunozytochemische Untersuchungen wurden (wie oben beschrieben) ebenfalls für die Expression des Kv1.4 K^+ Kanalmoleküls durchgeführt. Im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Konfiguration wurde unter Spannungsklemme das Membranpotential bestimmt. Bei den Kv1.4 negativen Zellen ergaben sich etwas kleinere Membranpotentialwerte ($V_m = -33 \pm 13$ mV, $n=4$) als bei den Kv1.4 positiven Zellen ($V_m = -51 \pm 14$ mV, $n=7$). K^+ Auswärtsströme wurden durch eine Reihe von depolarisierenden Spannungspulsen (-70 mV bis +90 mV) aktiviert. Die aus den Stromwerten errechneten Leitfähigkeiten wurden gegen die Spannung aufgetragen. Wie in Abb. 23 C dargestellt, ergeben die Leitfähigkeits-Spannungs-Kurven der Kv1.4 negativen und Kv1.4 positiven Zellen leicht unterschiedliche Verläufe. Während die Leitfähigkeiten der Kv1.4 negativen Zellen bei stark depolarisierenden Potentialen wieder abnehmen, zeigt die Kurve der Kv1.4 positiven Zellen keine Sättigung. Die aus dem Boltzmann-Fit der Leitfähigkeits-Spannungs-Kurve errechnete halbmaximale Aktivierungsspannung betrug $V_{1/2} = -4,8 \pm 5,81$ mV ($n=4$) für die Kv1.4 negativen Zellen sowie $V_{1/2} = +3,7 \pm 9,71$ mV ($n=5$) für die Kv1.4 positiven Zellen. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ergab keine Unterschiede hinsichtlich der Expression von Kv1.4 Proteinen. Die halbmaximalen Inaktivierungsspannungen betrugen $V_{1/2} = -60,1$ mV ($\pm 1,7$ mV, $n=3$) und $V_{1/2} = -20,9$ mV ($\pm 3,2$ mV $n=3$) für die Kv1.4 negativen Zellen sowie $V_{1/2} = -59,1$ mV ($\pm 4,5$ mV, $n=4$) und $V_{1/2} = -12,6$ mV (± 1 mV, $n=4$) für die Kv1.4 negativen Zellen. Der Anteil der ersten Stromkomponente betrug bei den Kv1.4 positiven Zellen 50 % ± 9 %, $n=4$ sowie 49 % ± 21 %, $n=3$ bei den Kv1.4 negativen Zellen und zeigten somit keine Unterschiede hinsichtlich der Kv1.4 Expression.



- Abbildung 23
Elektrophysiologische Eigenschaften von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Vergleich zur Expression des Kv1.4-Proteins
- Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik untersucht und anschließend immunozytochemisch auf die Expression von Kv1.4 getestet.
- A) Kv1.4 positive Oligodendrozyten-Vorläuferzelle. K⁺ Auswärtsströme wurden durch depolarisierende Spannungspulse (-70 bis +90 mV) aktiviert und zeigen eine leichte zeitliche Inaktivierung.
- B) Kv1.4 negative Oligodendrozyten-Vorläuferzelle.
- C) mittlere Strom-Spannungskurve von fünf Kv1.4 positiven Zellen (Quadrat) und vier Kv1.4 (Kreis) negativen Zellen.
- D) Mit Hilfe eines Vorpuls-Stimulationsprotokolls (s. Material und Methoden, 3.2.4.4.) wurde die Inaktivierung der K⁺ Ströme bei Kv1.4 positiven (Quadrat) und Kv1.1 negativen (Kreis) Zellen untersucht. Es treten keine Unterschiede in der Strominaktivierung auf.

4.2 Rolle von Kaliumkanälen bei der Neurotransmitterantwort

4.2.1 Hemmung von auswärts rektifizierenden K^+ Kanälen durch GABA

Auswärts rektifizierende Kaliumkanäle von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen können durch ionotrope Glutamaterezeptoren reguliert werden (Kainat-Typ) (Borges et al., 1994; Borges und Kettenmann, 1995). Da Oligodendrozyten-Vorläuferzellen auch ionotrope $GABA_A$ Rezeptoren exprimieren, ist es interessant zu untersuchen, ob die Aktivierung dieser Kanäle ebenfalls zu einer Modulation von spannungsabhängigen Kaliumkanälen führt. Da Körnerzellen in Kultur eine sehr viel höhere Dichte an $GABA$ -Rezeptoren exprimieren, wurden diese Zellen als Modellsystem für die Untersuchungen gewählt.

Körnerzellen aus den Kleinhirn von perinatalen Mäusen wurden in Zellkultur mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik im Ganzzell- und Einzelkanalmodus bezüglich ihres Kaliumkanalstromes bei Applikation des inhibitorischen Neurotransmitters $GABA$ untersucht.

Das Membranstrommuster der Körnerzellen ist durch die Expression von schnell inaktivierenden Na^+ -Strömen, auswärts rektifizierenden Kaliumströmen mit langsamer Inaktivierung oder keiner zeitlichen Inaktivierung ("delayed rectifier"-Typ) sowie schnell inaktivierenden Kaliumströmen ("A-Typ-" Ströme) geprägt (Abb. 24 A). Die Strom-Spannungs-Kurve (Abb. 24 B) zeigt, daß bei hyperpolarisierenden Potentialen nur sehr kleine Einwärtsströme fließen, bei Depolarisierung ab ca. -40 mV jedoch starke Auswärtsströme aktiviert werden.

$GABA_A$ -Rezeptoren sind ionotrope Membranrezeptoren, die bei Aktivierung mit der Öffnung eines intrinsischen Cl^- -Kanals reagieren. Appliziert man $GABA$ in einer Konzentration von 10^{-4} M für 15 s über die Badperfusion, kommt es bei einem Haltepotential von -60 mV zur Aktivierung eines Einwärtsstromes mit einer mittleren Amplitude von 450 pA (Bereich von 250 bis 950 pA; $n=27$). Zur weiteren Untersuchung dieses Stromes wurden die Kaliumströme durch Vorinkubation der Zellen für 3 min mit dem Kaliumkanalblocker Ba^{2+} gehemmt und $GABA$ (10^{-4} M) wurde in der Anwesenheit von Ba^{2+} appliziert (Abb. 24 C). Um dabei den zeitlichen Verlauf der Strom-Spannungskurven während der Applikation von $GABA$ untersuchen zu können, wurde die Membran wiederholt jeweils für 50 ms von einem Haltepotential von -60 mV auf eine Reihe von de- und hyperpolarisierenden Potentialen geklemmt (Abb. 24 C, oben). Die Strom-Spannungs-Kurve des $GABA$ -induzierten Stromes wurde durch Subtraktion des Stromes vor der $GABA$ -Zugabe vom Strom während der $GABA$ -Antwort erhalten (Abb. 24 D). Das mittlere Reversionspotential des $GABA$ -induzierten Stromes lag bei -2,4 mV (Bereich von -10 mV bis 0 mV, $n=5$). Dies entspricht in guter Näherung dem Gleichgewichtspotential für Cl^- (Nernst-Potential) von $E_{Cl}=-4,5$ mV für die verwendete Bad- und Pipettenlösung.

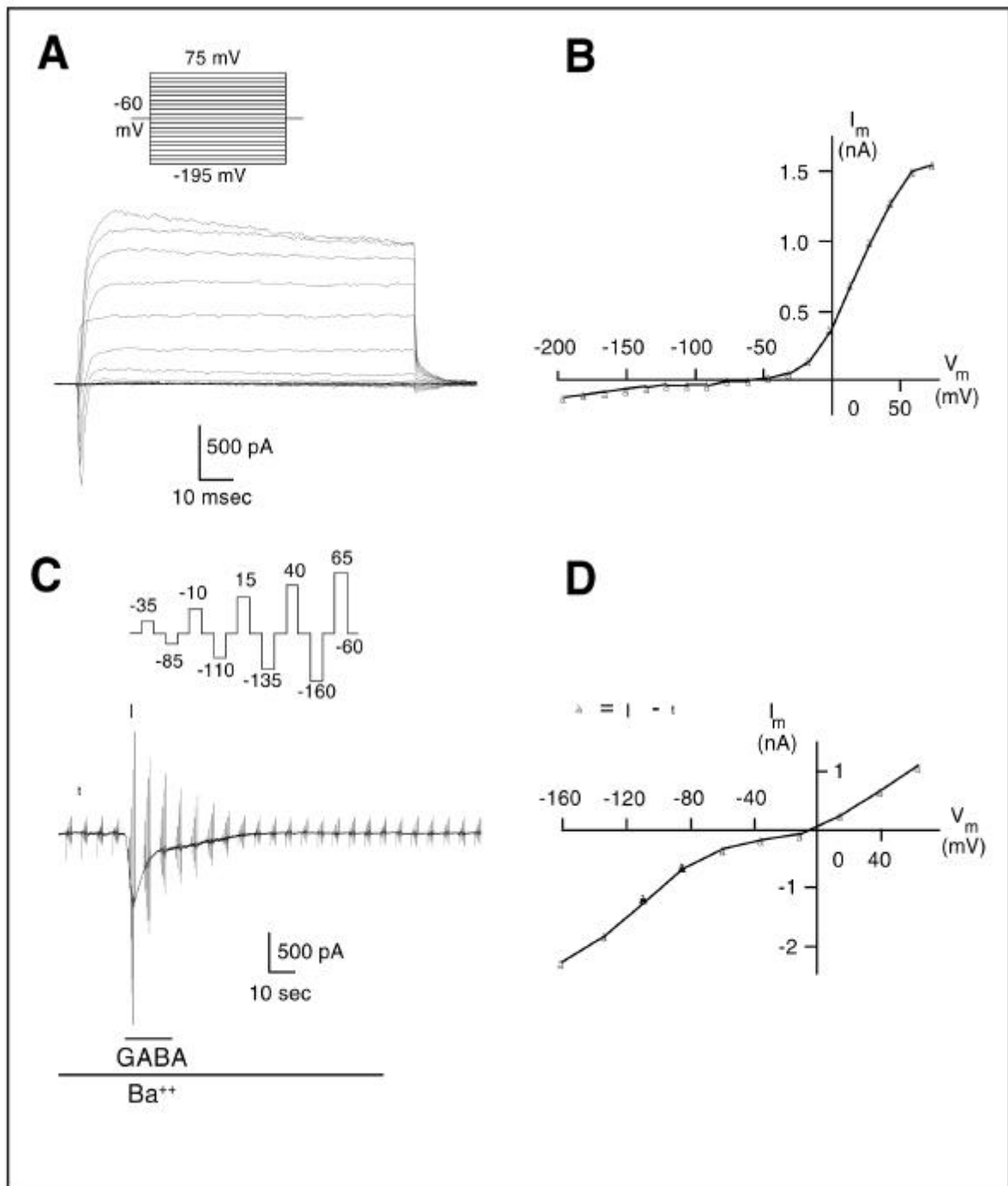


Abbildung 24
Kultivierte Körnerzellen reagieren auf die Applikation von GABA (10^{-4} M) mit der Aktivierung eines Auswärtswärtsstromes von Cl^- Ionen.

- A) Körnerzellen in Zellkultur wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik im Ganzzellmodus auf eine Reihe von de- und hyperpolarisierenden Spannungen geklemmt und die resultierenden Ströme gemessen.
- B) Die Strom-Spannungs-Kurve wurde aus den in A) dargestellten Membranströmen zum Zeitpunkt 40 ms nach Beginn des Spannungssprunges gewonnen. Bei Hyperpolarisation werden nur kleine Ströme aktiviert, während bei Depolarisation ab ca. -40 mV (typisch für "delayed rectifier") große Auswärtswärtsströme aktiviert werden.

- C) Während kontinuierlicher Stimulation der Zelle mit dem oben dargestellten Stimulationsprotokoll (s. auch Material und Methoden 3.2.4.2.) wurde GABA für 15 s über die Badperfusion appliziert. Zur Blockierung der K^+ Ströme wurden die Zellen für 3 min mit Ba^{2+} (10 mM) vorinkubiert und war Ba^{2+} während der gesamten Messung in der Perfusionslösung vorhanden. Durch die Zugabe von GABA wird ein Einwärtsstrom von ca. 750 pA aktiviert.
- D) Die Strom-Spannungs-Kurve des GABA-induzierten Stromes wurde durch Subtraktion des Stromes vor der GABA-Applikation von dem Strom während der GABA-Applikation gewonnen. Die resultierende Strom-Spannungs-Kurve ist annähernd linear und hat ein Reversionspotential nahe 0 mV.

Durch Anwendung des spezifischen Agonisten Muscimol soll getestet werden, ob die GABA-Antwort auf Körnerzellen durch $GABA_A$ -Rezeptoren vermittelt wird.

Der für $GABA_A$ -Rezeptoren spezifische Agonist Muscimol (10^{-4} M) führte ebenfalls zur Induktion eines Einwärtsstromes und zu einem Block von auswärts rektifizierenden K^+ Strömen (Abb. 25). Die durchschnittliche Leitfähigkeitserhöhung bei hyperpolarisierenden Potentialen betrug 10,1 nS (Bereich von 7,6 bis 14,3 nS; $n=7$), die durch Muscimol induzierte mittlere Leitfähigkeitsreduktion bei Depolarisation betrug 28,5% (Bereich von 19,5 bis 38,3 %; $n=7$), vergleichbar mit den bei GABA erhaltenen Werten.

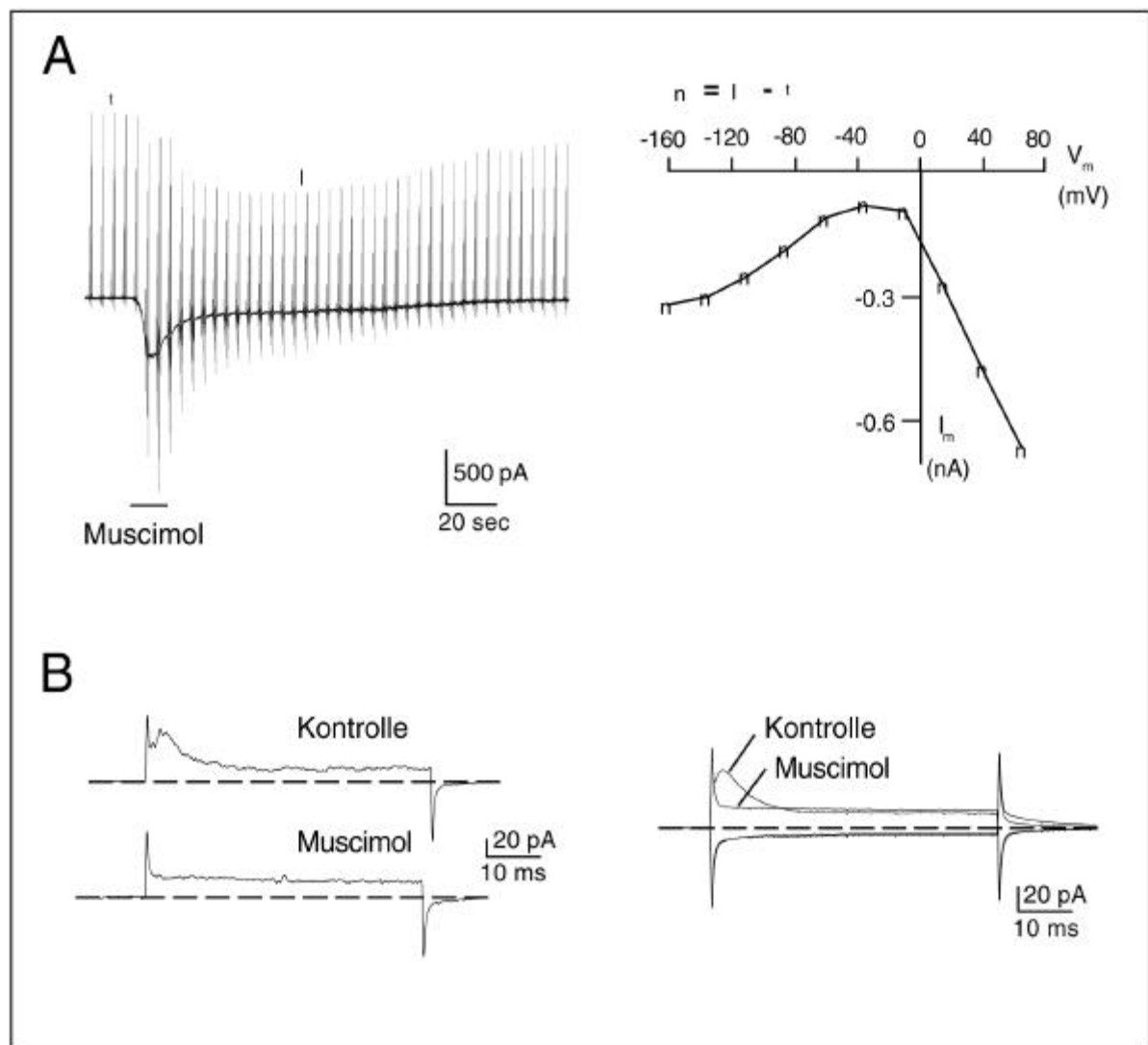


Abbildung 25
Der $GABA_A$ -Rezeptor-Agonist Muscimol reproduziert die durch GABA hervorgerufenen Effekte an kultivierten Körnerzellen

- A) Membranströme von kultivierten Körnerzellen wurden im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Technik mit dem in Fig. 4-15C beschriebenen Stimulationsprotokoll gemessen. Die Applikation von Muscimol (10^{-4} M) führt (wie die Applikation von GABA) zur Induktion eines Cl^- Einwärtsstromes und zur Blockierung von K^+ -Auswärtsströmen. Die Strom-Spannungs-Kurve (rechte Darstellung) wurde durch Subtraktion des Stromes vor der Zugabe von GABA vom Strom bei maximalem Block der K^+ -Ströme erhalten.
- B) Muscimol (10^{-4} M) blockiert im "cell-attached-" Modus der Patch-Clamp-Technik registrierte K^+ Kanäle. Durch Membrandepolarisierung (+30 mV) werden mehrere unter der Pipette befindliche auswärts rektifizierende K^+ Kanäle geöffnet. Diese werden durch die Zugabe von Muscimol (10^{-4}) geblockt.

Die Antwort der Körnerzellen auf die Applikation von GABA führt in Abwesenheit des Kaliumkanalblockers Ba^{2+} zu einer komplexen Stromantwort bestehend aus einer Leitfähigkeitserhöhung bei hyperpolarisierenden Potentialen (Einwärtsstrom) und einer Leitfähigkeitserniedrigung bei Depolarisation (Abb. 26 A, obere Darstellung). Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einem Chlorid-Auswärtsstrom über den in den Rezeptor integrierten Chloridkanal sowie zu einer Hemmung von auswärts rektifizierenden Kaliumkanälen. Diese beiden Effekte können aufgrund ihrer Spannungsabhängigkeit getrennt werden. Bei Potentialen von -60 mV (und negativer) kommt es bei der Zugabe von GABA durch die Aktivierung eines Cl^- Auswärtsstromes zu einer linearen Leitfähigkeitserhöhung von durchschnittlich 8,6 nS (Bereich von 3,4 bis 13,6 nS, $n=8$ bei -60 mV), die innerhalb von 3 min vollständig reversibel ist. Die Inhibierung der Kaliumkanäle wird bei Depolarisierung auf Potentiale von -35 mV (und positiver) meßbar. Durch die Hemmung der Kaliumströme kommt es zu einer Leitfähigkeitsreduktion von durchschnittlich 27 % (19 bis 43 %, $n=24$). Um die beiden sich überlagernden Effekte zu trennen, wurde die Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation von der jeweiligen Leitfähigkeit bei Depolarisation abgezogen (Abb. 26 A, untere Darstellung). Auf diesem Wege erhält man eine Reduktion der Kaliumleitfähigkeit von 22,3 nS (Bereich von 18,6 bis 25,3 nS; $n=8$) vor GABA-Applikation auf 6,5 nS (Bereich von 2,9 bis 8,7 nS), was einer Reduktion um durchschnittlich 71% (Bereich von 66 bis 85 %; $n=8$) entspricht.

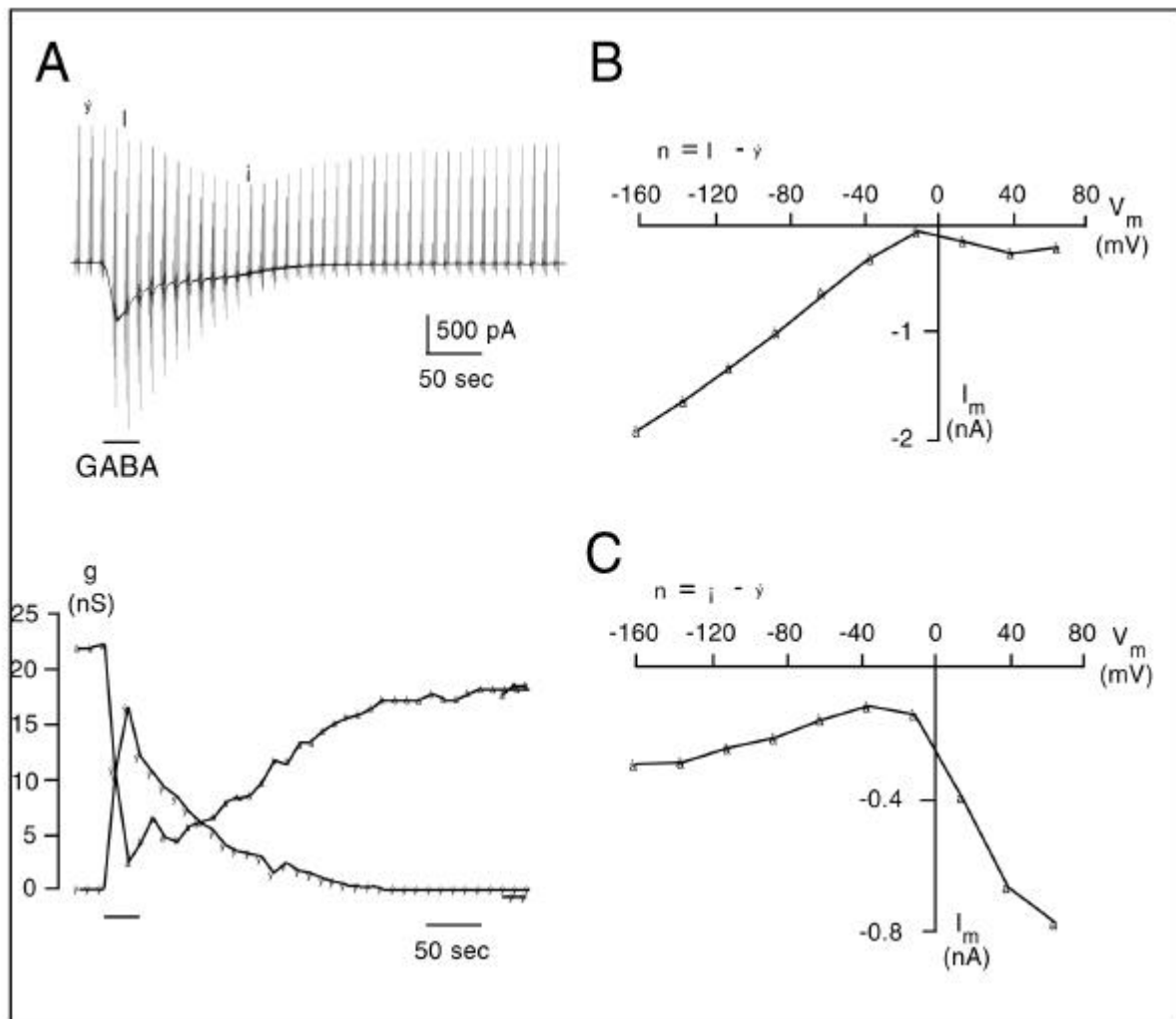


Abbildung 26
Die GABA-Antwort bei kultivierten Körnerzellen besteht aus zwei Komponenten.

- A) Applikation von GABA (10^{-4} M) führt bei kultivierten Körnerzellen zu einer komplexen Stromantwort bestehend aus der Induktion des Cl⁻-Auswärtsstromes und einer Hemmung von K⁺-Auswärtsströmen. Die Membranströme wurden durch die in Abb. 24 C beschriebene Stimulation erzeugt. Der Zeitverlauf der durch GABA hervorgerufenen Leitfähigkeitsänderungen (untere Darstellung) wurde aus der Stromspur (obere Darstellung) berechnet. Dazu wurde die Einwärtsleitfähigkeit aus den Stromwerten bei Potentialen zwischen -60 und -110 mV berechnet und die Leitfähigkeit vor der Applikation von GABA abgezogen (Dreiecke). Die Leitfähigkeit steigt schnell an und fällt dann innerhalb von 3 min wieder auf den Ruhewert ab. Die Auswärtsleitfähigkeit wurde aus den Stromwerten bei Potentialen zwischen -10 und +40 mV bestimmt und die Einwärtsleitfähigkeit wurde von der so berechneten Auswärtsleitfähigkeit abgezogen (Kreise).
- B) Strom-Spannungs-Kurve des durch GABA induzierten Stromes zum Zeitpunkt der maximalen Stromantwort, Ströme vor der Applikation von GABA wurden subtrahiert.
- C) Strom-Spannungs-Kurve zum Zeitpunkt des maximalen K⁺ Kanalblocks, die Ströme vor der Applikation von GABA wurden subtrahiert.

Die auswärts rektifizierenden Kaliumströme setzen sich bei Körnerzellen aus zwei unterschiedlichen Anteilen zusammen, den "delayed rectifier-" K⁺-Strömen und den "A-Typ-" K⁺-Strömen. Die schnell inaktivierenden "A-Typ-" K⁺-Ströme werden durch vorhergehende Hyperpolarisierung aktiviert. Zur Isolation der A-Strom-Komponente wurde ein Spannungssprung jeweils vom Haltepotential (-50 mV) und von -120 mV ausgeführt und die Ströme subtrahiert (Abb. 27 B Inset). Die Applikation von GABA (10^{-4} M) führt sowohl zur Hemmung des nicht inaktivierenden "delayed rectifier-" Stromes (um 27,8 %, n=5) (Abb. 27 A) als auch zur Hemmung des schnell inaktivierenden "A-Typ-" Stromes (30,8 %, n=5).

n=5) (Abb. 27 B).

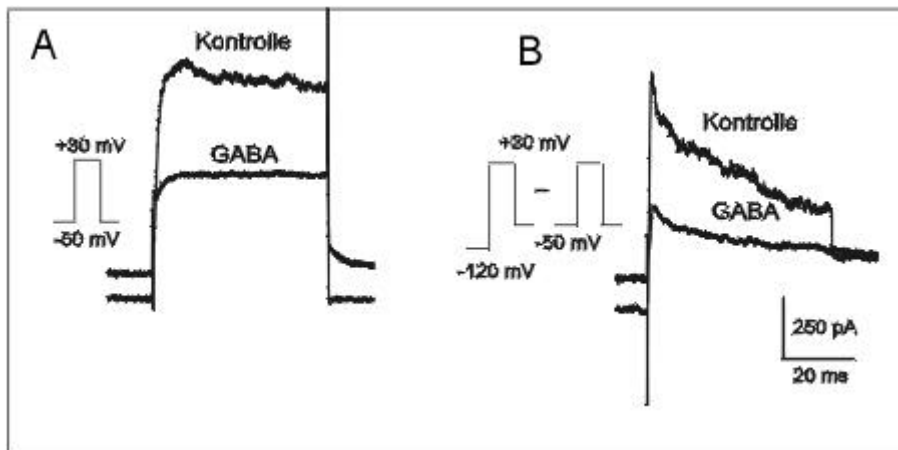


Abbildung 27
Effekt von GABA auf den "delayed rectifier-" und den "A-Typ-" Strom bei Körnerzellen

- A) -Ströme vom "delayed rectifier-" Typ wurden auf kultivierten Körnerzellen durch depolarisierende Spannungspulse im Ganzzellmodus der Patch-clamp-Technik für 50 ms auf +30 mV aktiviert. Die Zugabe von GABA (10^{-4} M) hemmt den "delayed rectifier-" Strom.
- B) Zur Isolation des A-Strom-Anteils wurden depolarisierende Spannungssprünge auf +30 mV nach vorhergehender Hyperpolarisation für 300 ms auf -120 mV ausgeführt und die durch die in A) beschriebene Stimulation hervorgerufenen "delayed rectifier-" Ströme wurden subtrahiert. Die resultierenden Ströme zeigen die für A-Typ-Ströme typische schnelle Inaktivierung. Die Zugabe von GABA (10^{-4} M) hemmt ebenfalls die A-Strom-Komponente von kultivierten Körnerzellen.

4.2.2 GABA blockiert die K^+ Einzelkanalaktivität

Um den Mechanismus des K^+ Kanalblocks bei Aktivierung des GABA-Rezeptors zu analysieren, wurden weitere Untersuchungen im Einzelkanalmodus der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Dazu wurden sowohl Einzelkanal- als auch Vielkanalpatches im "cell-attached" Modus untersucht. K^+ Kanäle wurden aufgrund ihres Reversionspotentials von 0-10 mV relativ zum Ruhepotential der Zelle (K^+ Nernst-Potential) identifiziert. Zur Charakterisierung der Kanäle wurden ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV (Membranruhepotential) Spannungssprünge zu verschiedenen depolarisierenden Potentialen ausgeführt (Abb. 28 B, linke Darstellung). Im Falle von Vielkanalpatches wurden depolarisierende Spannungssprünge auf 50, 70 und 90 mV wiederholt (50mal) ausgeführt und die resultierenden Ströme wurden gemittelt. Diese gemittelten Stromspuren zeigten entweder "delayed rectifier-" (Abb. 28 B, rechte Darstellung) oder "A-Strom-" Charakter (Abb. 25 B).

GABA (oder Muscimol) wurden über die Badperfusion appliziert und wirkten somit auf die Membranrezeptoren außerhalb des unter der Patchpipette befindlichen Membranstücks (s. Abb. 28 A). Das Signal zur Beeinflussung der K^+ Kanäle muß also über das Zytoplasma übertragen werden. Die Applikation von GABA führte zur Reduktion oder vollständigen Blockierung der K^+ Einzelkanalströme (Abb. 28 C) oder Vielkanalströme (Abb. 25B). Dabei ändert sich die Leitfähigkeit der Kanäle nicht, sondern die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle wird zum Teil bis zum kompletten Schließen des Kanals verringert. Diese entspricht dem zeitlichen Anteil, der vom Kanal im offenen Zustand verbracht wird. Die Reduktion der Kanalaktivität war nach Auswaschen von GABA nicht immer vollständig reversibel.

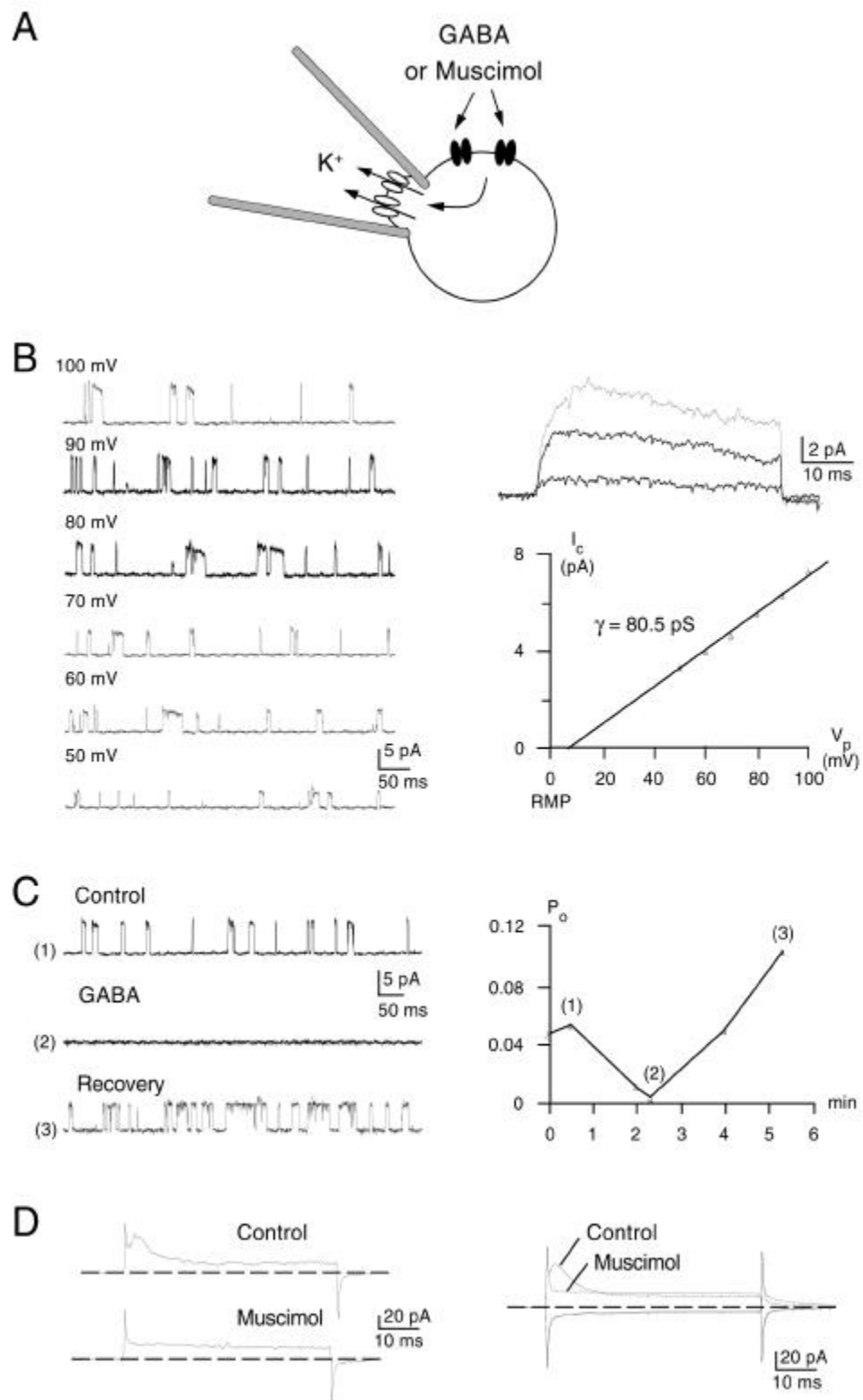


Abbildung 28
GABA blockiert auswärts rektifizierende K⁺ Kanäle in der "cell-attached-" Konfiguration

- A) Einzelkanäle (bzw. Vielkanalströme) auf dem von der Pipette isolierten Membranstück wurden mit der Patch-clamp-Technik in der "cell-attached-" Konfiguration gemessen. GABA (10^{-4} M) wurde über die Badperfusion appliziert und konnte somit nur auf Membranrezeptoren außerhalb der Patchpipette wirksam werden. Das Signal von den GABA-Rezeptoren zu den unter der Patchpipette befindlichen Kaliumkanälen wird somit auf dem Wege über das Zytoplasma weitergeleitet.
- B) Ströme durch auswärts rektifizierende Kaliumkanäle bei verschiedenen depolarisierenden Haltepotentialen (relativ zum Membranruhepotential). Die Kanalöffnungen sind nach oben aufgetragen. Aus der Strom-Spannungs-Kurve (rechts) ergibt sich eine Einzelkanalleitfähigkeit von $\gamma = 80,5$ pS und ein Reversionspotential nahe 0 mV (dem Membranruhepotential). Die durch Mittlung der Ströme von jeweils 50 Spannungssprüngen auf 50, 70 und 90 mV entstehende Stromspur zeigt eindeutig das Zeitverhalten eines "delayed rectifier-" K^+ Kanals (Darstellung oben rechts).
- C) Die Zugabe von GABA führt zu einem nahezu vollständigen Block der K^+ Ströme (selbe Zelle wie in B). Auswaschen von GABA führt hier nicht nur zur Wiederherstellung der ursprünglichen Aktivität, sondern zu erhöhter Kanalaktivität. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach der Applikation von GABA berechnet und zeitlich aufgetragen (Darstellung rechts).

Die Stärke des Rauschens (d.h. der Amplitudenschwankungen) einer Stromspur ist ein Maß für die Anzahl der geöffneten Kanäle. Die Analyse des Stromrauschens stellt also eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Ionenkanalaktivitäten dar. Dazu wurde in der Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-Technik das Stromrauschen beim Haltepotential von -60 mV und bei einem Potential von 0 mV bestimmt. Da -60 mV annähernd mit dem Reversionspotential von K^+ übereinstimmt, wird bei dieser Membranspannung das Rauschen ausschließlich durch Cl^- Ionen bestimmt, während bei 0 mV, dem Reversionspotential von Cl^- , das Rauschen durch K^+ Ionen verursacht wird. Diese beiden Potentiale wurden alternierend für jeweils 500 ms (für mehrere Minuten) appliziert und die resultierenden Ströme wurden mit hoher Zeitauflösung (10 kHz) aufgezeichnet. GABA oder Muscimol (10^{-4} M) wurden während der Aufzeichnung für 15 s appliziert. Die Häufigkeit der gemessenen Stromamplituden während einer bestimmten Zeitspanne vor, während und nach der GABA-Antwort wurden jeweils in einem Histogramm (Amplitudenhistogramm) dargestellt (s Abb. 29 unten). Da der Strom in diesem Zeitfenster um einen bestimmten Wert variiert, haben die Amplitudenhistogramme die Form einer Gauß-Kurve. Die Höhe des Stromrauschens entspricht der Breite der Gauß-Kurven und ergibt sich aus der Standardabweichung der Gaußverteilung. Bei einem Membranpotential von 0 mV betrug die mittlere Varianz der Gaußverteilung $5,2 \cdot 10^{-5} \text{ nA}^2$ ($n=5$) und verringerte sich während der Zugabe von GABA (bzw. Muscimol) auf $4,1 \cdot 10^{-5} \text{ nA}^2$, was einer Reduktion um 21 % entspricht. Im Gegensatz dazu erhöhte sich das Stromrauschen bei -60 mV in Gegenwart von GABA (oder Muscimol) von $0,8 \cdot 10^{-5} \text{ nA}^2$ auf $7,2 \cdot 10^{-5} \text{ nA}^2$ auf 900 % des Kontrollwertes.

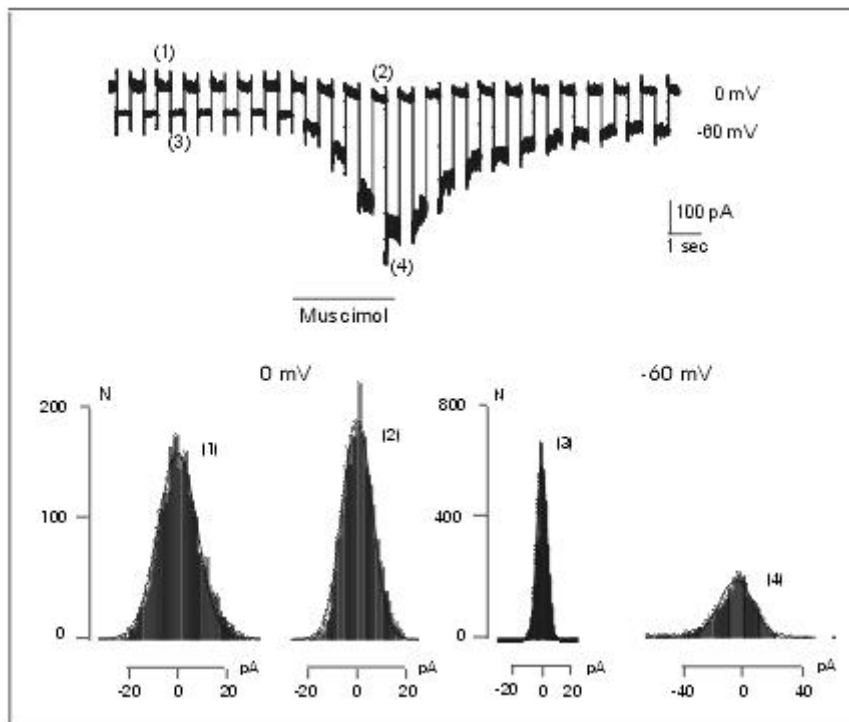


Abbildung 29
Analyse des Stromrauschens während der Applikation von Muscimol (10^{-4} M)

Die Zellmembran von kultivierten Körnerzellen wurde im Ganzzellmodus der Patch-clamp-Konfiguration jeweils für 500 ms alternierend auf -60 mV und 0 mV geklemmt und die resultierenden Ströme wurden aufgezeichnet (obere Darstellung). Daraus wurden die Amplitudenhistogramme vor (1, 3) und während der Zugabe von Muscimol (2, 4) berechnet und mit einer Gauß-Funktion angepaßt. Die Varianz der Gaußfunktion ist ein Maß für das Rauschen und damit für die Anzahl geöffneter Kanäle. Applikation des GABA_A-Agonisten Muscimol führt zu einem Einwärtsstrom verbunden mit einem erhöhten Stromrauschen bei -60 mV und zur Reduktion von Auswärtsströmen bei 0 mV. Die Varianz der Gaußverteilung bei 0 mV verringerte sich von $11,2 \cdot 10^{-5} \text{ nA}^2$ vor der Applikation auf $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ nA}^2$ während der Zugabe von Muscimol (unten links). Bei einem Haltepotential von -60 mV hingegen erhöhte sich das Stromrauschen von $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ nA}^2$ vor der Muscimol-Applikation auf $45,2 \cdot 10^{-5} \text{ nA}^2$ während der Muscimolapplikation (unten rechts).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Expression spannungsaktivierbarer Kaliumkanäle des Kv1-Typs (*Shaker*-Typ) in kultivierten glialen Vorläuferzellen der Maus untersucht. Dazu wurden die Expression von Kv1 Transkripten, die Kv1 Proteinexpression sowie die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Membranströme miteinander verglichen. Weiterhin wurde die Regulierung dieser Kaliumkanäle durch die Aktivierung von Neurotransmitterrezeptoren untersucht.

5.1 Oligodendrozyten verfügen über ein heterogenes Repertoire von Kaliumkanälen

Patch-Clamp-Untersuchungen im Ganzzellmodus zeigten bei allen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen des verwendeten Zellkultursystems eine starke Expression spannungsaktivierter, auswärts rektifizierender Kaliumströme.

Die Eigenschaften von spannungsaktivierten Kaliumströmen in glialen Vorläuferzellen wurden in ähnlichen Zellkultursystemen (Sontheimer et al., 1989; Borges et al., 1994) sowie in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in lebenden Hirnschnittpräparaten des corpus callosum (Berger et al., 1991) untersucht. Über die molekulare Identität dieser Ströme sowie deren Beitrag zum Gesamtstrom gibt es derzeit noch keine Untersuchungen. In dieser Arbeit wurde die funktionelle Expression von auswärts rektifizierenden Kaliumkanälen der Kv1 (*Shaker*) Familie sowie deren Beitrag zum Gesamtzellstrom auf Protein- und mRNA-Ebene analysiert.

Die auswärts rektifizierenden Kaliumströme von der untersuchten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zeigten eine starke Heterogenität ihrer elektrophysiologischen (z.B. Kanalinaktivierung) und pharmakologischen Eigenschaften (Sensitivität gegen spezifische Kaliumkanalblocker). Die Heterogenität der Stromeigenschaften von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ist in verschiedenen Arbeiten untersucht worden (Kettenmann et al., 1991; Sontheimer et al., 1989).

Bei eigenen Einzelkanalexperimenten im "cell-attached" und im "inside-out" Modus der Patch-Clamp-Konfiguration wurde eine heterogene Leitfähigkeitsverteilung mit einer Vielzahl unterschiedlicher Einzelkanalleitfähigkeiten von auswärts rektifizierenden Kaliumkanälen gefunden.

Unterschiede der Einzelkanaleigenschaften wurden ebenfalls bei verschiedenen weiteren Oligodendrozyten-Präparationen festgestellt, z.B. kultivierten Oligodendrozyten aus dem Rind (McLarnon und Kim, 1989), Oligodendrozyten aus dem Rückenmark der Maus (Kettenmann et al., 1984) und Schwannzellen der Maus (Verkhatsky et al., 1991).

Die größte Gruppe spannungsabhängiger Kaliumkanalmoleküle bildet die Kv1 (*Shaker*) Familie. Die molekulare und funktionale Expression dieser Kanäle wurde in dieser Arbeit mit einer Kombination von molekularbiologischen und elektrophysiologischen Techniken untersucht.

5.2 Expression von Kv1 Kaliumkanalproteinen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Zur Untersuchung der Expression der Kv1 Proteine wurden immunozytochemische Färbungen mit für die Kanalmoleküle Kv1.1 bis Kv1.6 spezifischen polyklonalen Antikörpern durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß die Kanalmoleküle Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6 in fast allen Zellen exprimiert werden; Kv1.1 Kanäle wurden nur in wenigen Zellen (10 %) gefunden.

In Gliazellen sind spannungsabhängige Kaliumkanäle der Kv1 Familie bis jetzt nur in Schwannzellen im peripheren Nervensystem sowie in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen gefunden worden. In kultivierten Oligodendrozytenvorläuferzellen aus neonatalen Ratten wurde die Expression von verschiedenen Kv1 Proteinen (Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6) beschrieben (Attali et al., 1997). In Schwannzellen des Ischiasnervs hingegen wurde die Expression von Transkripten und Proteinen des Kv1.1 und Kv1.5 Kaliumkanals gefunden (Mi et al., 1995).

Die gleichzeitige Expression von mehreren Kv1 Kanälen wurde auch in anderen Zelltypen gefunden. So wurde z.B. in einer Präparation von Herzmuskelzellen des Frettchens die Expression von bis zu 10 Kv Transkripten (4 der 6 Kv1 Transkripte) festgestellt (Brahmajothi et al., 1997).

Um Abschätzungen über die Expressionsrate der Kanäle sowie ihren Beitrag zum Gesamtstrom zu

machen, wurden diese Experimente mit einer umfassenden elektrophysiologischen und pharmakologischen Untersuchung kombiniert.

5.3 Beitrag der Kv1 Kanäle zum Gesamtstrom

Mit einer Kombination von elektrophysiologischen und pharmakologischen Untersuchungen sowie immunozytochemischen Färbungen wurde die funktionelle Expression von allen bis jetzt bekannten Kv1 Kaliumkanälen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Maus bestimmt.

Die homomeren Kv1 Kanäle sind hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften in Expressionssystemen bereits intensiv untersucht worden (z.B. Stühmer et al., 1989, Grissmer et al., 1994).

Vergleicht man die im Rahmen dieser Arbeit an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen gemessenen Parameter mit den Literaturdaten, so kommt man zu folgenden Schlußfolgerungen:

- 1) Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 und Kv1.6 haben keinen großen Beitrag am Gesamtzellstrom. Für diese Kanäle ist eine hohe Sensitivität gegen die spezifischen Toxine Dendrotoxin (DTX), Charybdotoxin (CTX) und MCDP (mast cell degranulating peptide) beschrieben (Stühmer et al., 1989; Grissmer et al., 1994; Kirsch et al., 1991), die auswärts rektifizierenden Kaliumströme von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden durch die Applikation dieser Substanzen jedoch nicht gehemmt. Die Kanäle Kv1.2 und Kv1.3 wurden außerdem mit den immunozytochemischen Färbungen nicht nachgewiesen.
- 2) Homomere Kv1.1-Kanäle zeigen bei Expression in Säugerzellen bzw. *Xenopus laevis* Oozyten eine hohe TEA-Sensitivität (Stühmer et al., 1989; Grissmer et al., 1994; Klumpp et al., 1991). Die hier gemessene TEA-Sensitivität (29 mM) lag jedoch um zwei Zehnerpotenzen höher als für homomere Kv1.1 Kanäle zu erwarten (0,3 mM, Grissmer et al., 1994). Das Kv1.1 Protein wurde bei 10 % der Zellen gefunden.
Um den Beitrag der Kv1.1 Kanäle zum Gesamtzellstrom zu bestimmen, wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften von Kv1.1 positiven und Kv1.1 negativen Zellen verglichen. Die dabei gefundenen Unterschiede lagen im Bereich der Schwankungsbreite. Dies läßt vermuten, daß die Kv1.1 Kanäle nur in geringer Anzahl exprimiert werden und keinen großen Beitrag zum Gesamtstrom leisten.
- 3) Das Vorkommen von homomeren Kv1.4 Kanälen ist ebenfalls auszuschließen, da diese eine schnelle Inaktivierung im Bereich von wenigen ms (Lee et al., 1996) zeigen (N-Typ-Inaktivierung). Außerdem zeigen diese Kanäle eine kumulative Inaktivierung bei wiederholter Aktivierung der Kanäle (Bertoli et al., 1996; Bertoli et al., 1994), die in diesen Zellen ebenfalls nicht beobachtet wurde.
- 4) Für das Auftreten von Kv1.5 Homomeren sprechen mehrere Tatsachen. Kv1.5 Kanäle sind insensitiv gegen CTX, DTX und MCDP, jedoch sensitiv für 4-AP und Chinidin (Grissmer et al., 1994; Pak et al., 1991). Die halbmaximalen Blockerkonzentrationen für diese beiden Substanzen stimmen in guter Näherung mit den gemessenen Werten überein. Kv1.5 Proteine wurden in allen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (99 %) nachgewiesen.
- 5) Ebenfalls ist die Bildung von heteromeren Kv1 Kanälen (Kv1.4 und/oder Kv1.5 und/oder Kv1.6) möglich.

Roy et al., 1996 untersuchten mit Antisense-Oligonukleotiden die funktionale Expression von Kv1 Kanälen in Astrozyten des Rückenmarks der Maus. Dabei fanden sie, daß die Expression von Kv1.5 Kanälen in hohem Maße zum Gesamtzellstrom beiträgt. Weitere Kv1 Kanäle wurden jedoch nicht getestet.

5.4 Einfluß der Kv1.1 bzw. Kv1.4 Expression auf die elektrophysiologischen Eigenschaften

In Oligodendrozyten-Vorläuferzellen werden Kv1.1 und Kv1.4 Kanäle nur in einem Teil der Zellen exprimiert (Kv1.1: 10 % und Kv1.4: 85 % der Zellen). Mit einer Kombination von elektrophysiologischer Analyse im "whole-cell" Modus der Patch-Clamp-Technik und immunozytochemischen Färbungen sollte deren Beitrag zum Gesamtzellstrom bestimmt werden.

Es wurden keine Unterschiede in der Kanalaktivierung und -inaktivierung sowie der Membranpotentiale zwischen Kv1.1 positiven und Kv1.1 negativen bzw. Kv1.4 positiven und Kv1.4

negativen Zellen festgestellt. Die Unterschiede beim Membranpotential bei Kv1.4 positiven bzw. negativen Zellen sowie bei der Kanalinaktivierung bei den Kv1.1 positiven bzw. negativen Zellen liegen im Bereich der für diese Zellen beobachteten Schwankungen. Aus den Resultaten ist zu schließen, daß spannungsabhängige K⁺ Kanäle des Kv1.1 und Kv1.4 Typs nur einen geringen Beitrag zum Gesamtzellstrom leisten.

Analoge Experimente sind von Gurantz et al. (Gurantz et al., 1996) an Rückenmarksneuronen durchgeführt worden. Die Autoren untersuchten mit einer Kombination von Einzelzell-PCR und Patch-Clamp-Untersuchung im Ganzzellmodus die Korrelation der Expression der Kv1.1 (und Kv2.2) Transkripte mit Unterschieden im Strommuster von Rückenmarksneuronen. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der Kv1.1 Transkripte und elektrophysiologischen Parametern gefunden werden.

5.5 Expression von weiteren spannungsregulierten K⁺ Kanälen

Die Experimente zur Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung weisen auf das Vorhandensein von zwei Kanalpopulationen mit unterschiedlichen Inaktivierungseigenschaften hin. Die halbmaximale Inaktivierung der ersten Kanalpopulation mit $V_{1/2} = -60$ mV liegt im Bereich der für Kv1 Kanäle beschriebenen Werte (Stühmer et al., 1989). Die zweite Kanalpopulation inaktiviert mit $V_{1/2} = -12$ mV bei sehr viel positiveren Potentialen, wie sie für Kv2 (Shab) und Kv3 (Shaw) Kanäle beschrieben wurde (Shahidullah et al., 1995; Salinas et al., 1997).

Von den zur Charakterisierung der Kaliumströme eingesetzten Blockern (4-AP, TEA, Chinidin, DTX, CTX und MCDP) wurde jeweils nur ein Teil des Stromes geblockt. Z.B. war der durch 4-AP geblockte Strom zeitlich inaktivierend (s. Abb. 12), durch TEA (1-100 mM) hingegen wurde ein zeitlich nicht inaktivierender Strom geblockt (s. Abb. 11). In Bezug auf diese Blocker können also ebenfalls mindestens zwei unterschiedliche Populationen von Kanälen unterschieden werden.

5.6 Pharmakologie der homomeren Kv1 Kanäle

Die Ganzzellströme der bekannten auswärts rektifizierenden Kaliumkanäle (Homomere) sind in Expressionsexperimenten gut charakterisiert (u.a. Grissmer et al., 1994; Stühmer et al., 1989).

In der folgenden Tabelle sind die pharmakologischen Parameter der homomeren Kv1 Kanäle bei Expression in Säugerzellen (z.B. Grissmer et al., 1994) oder Xenopus Oozyten (z.B. Stühmer et al., 1989) zusammengefaßt und mit den an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen gemessenen Parametern verglichen. Die Konzentrationsangaben sind halbmaximale Blockerkonzentrationen (IC₅₀-Werte).

	4-AP (mM)	TEA (mM)	Chinidin (μ M)	CTX (μ M)	DTX (μ M)	MCDP (μ M)
Kv1.1	0,29 ¹⁾ 1 ²⁾ 1,1 ³⁾	0,3 ¹⁾ 0,6 ²⁾ 0,4 ³⁾	41 ¹⁾	>1 ¹⁾ 0,022 ²⁾	0,02 ¹⁾ 0,012 ²⁾	0,49 ¹⁾ 0,045 ²⁾
Kv1.2	0,59 ¹⁾ 0,8 ²⁾	0,00056 ¹⁾ 129 ²⁾	40 ⁷⁾	0,014 ¹⁾ 0,006 ²⁾	0,017 ¹⁾ 0,004 ²⁾	0,44 ¹⁾ 0,175 ²⁾
Kv1.3	0,195 ¹⁾ 1,5 ²⁾	10 ¹⁾ 50 ²⁾		0,0026 ¹⁾ 0,001 ²⁾	0,25 ¹⁾ >0,6 ²⁾	>2 ¹⁾ >1 ²⁾
Kv1.4	12,5 ²⁾	>100 ²⁾	22 ⁸⁾	>0,04 ²⁾	>0,2 ²⁾	>2 ²⁾
Kv1.5	0,27 ¹⁾ 0,4 ⁵⁾	330 ¹⁾ >40 ⁴⁾	7,2 ⁹⁾	>0,1 ¹⁾ >0,2 ⁴⁾	>1 ¹⁾ >0,2 ⁴⁾	>10 ¹⁾ >600 ⁴⁾
Kv1.6	0,3 ⁶⁾	4 ⁵⁾ 1,7 ⁶⁾		>3 ⁶⁾	0,025 ⁶⁾	0,2 ⁶⁾
Oligodendrozyten-Vorläuferzellen						
	0,19	29	16,61/ 36,13	>>1	>>2	>>4

Tabelle 3
Blockierbarkeit von homomeren Kv1 Kanälen durch spezifische K⁺ Kanalblocker

- 1) Grissmer et al., 1994
- 2) Stühmer et al., 1989
- 3) Klumpp et al., 1991
- 4) Pak et al., 1991
- 5) Swanson et al., 1990
- 6) Kirsch et al., 1991
- 7) Grissmer et al., 1990
- 8) Grissmer, nicht publiziert
- 9) Fedida, 1997

Diese Daten lassen sich jedoch nur schwer mit den nativ vorkommenden Strömen vergleichen. In der Literatur gibt es nur wenige Beispiele, in denen die Ströme realer Zellen direkt einem bekannten Typ spannungsabhängiger Kaliumkanäle zugeordnet werden können. So werden z.B. die delayed rectifier K⁺ Kanäle von C6-Glioma-Zellen sowie von Typ1 und Typ2- Astrozyten Kv1.1 Kanälen zugeordnet (Wang et al., 1992). Die n-Typ K⁺ Kanäle in Lymphozyten hingegen werden durch Kv1.3 Kanäle getragen (Attali et al., 1992).

Ebenfalls wurden in unterschiedlichen Expressionssystemen z.T. sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Zum Beispiel wurde in *Xenopus* Oozyten eine sehr hohe TEA-Sensitivität des Kv1.2 Kanals gemessen (Stühmer et al., 1989), während bei Expression in Säugerzellen die Sensitivität gegenüber TEA um mehrere Zehnerpotenzen höher lag (Grissmer et al., 1994).

Bei der Zuordnung des Stromes zu einem bestimmten Kanalmolekül müssen vor allem folgende Umstände mit berücksichtigt werden:

- a) Bildung von heteromeren Kv1 Komplexen
- b) Bindung von β -Untereinheiten
- c) Posttranslationalen Regulationsmechanismen

5.7 Bildung von heteromeren Kv1 Kanälen

K⁺ Kanäle können innerhalb einer Familie heteromere Kanalmoleküle bilden (Ruppersberg et al., 1990; Rudy et al., 1988). Das Vorkommen solcher heteromeren Kanäle *in situ* wurde durch Sheng (Sheng et al., 1993) im Gehirn von Ratten erstmals gezeigt. Die Bildung von heteromeren Kv1.2/Kv1.4 Kanälen in Axonen und Nerven terminalen führt zur Ausbildung eines A-Typ-Stromes mit gemischten Eigenschaften.

Eine Reihe von heteromeren Kv1 Kanälen ist bereits beschrieben worden (Lee et al., 1994; Lee et al., 1996). Die Rolle der Kv1.5 Untereinheit wurde jedoch in keiner der vorliegenden Arbeiten untersucht.

Ströme von heteromeren Kanälen können sich dramatisch von den Strömen der homomeren Kanäle unterscheiden (Hopkins et al., 1994).

Bei den vorliegenden Untersuchungen waren aufgrund der immunozytochemischen Untersuchungen vor allem Kombinationen von heteromultimeren Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6 Kanälen zu erwarten.

In heteromeren Kanälen, die den Kv1.4 Kanal enthalten, sollte aufgrund der typischen N-Typ Inaktivierung dieses Kanals ein Teil des Stromes innerhalb kurzer Zeit inaktivieren. Die Zeitkonstante der Inaktivierung bei Oligodendrozyten-Vorläuferzellen liegt mit $\tau = 34$ ms weit über diesem Wert.

Kürzlich wurde beschrieben, daß die Expression von heteromeren Kv1.4/ Kv1.6 Kanälen zu einem Kanal mit langsamer Inaktivierung und Eigenschaften ähnlich dem homomeren Kv1.5 Kanal führt (Roeper et al., 1998). Am C-Terminus des Kv1.6 Moleküls wurde eine sogenannte NIP-Domäne (N-type inactivation particle) gefunden, die den Inaktivierungs-Partikel des Kv1.4 Moleküls, der die schnelle N-Typ-Inaktivierung bewirkt, bindet.

5.8 Bindung von β -Untereinheiten

Mit spannungsabhängigen K⁺ Kanälen der Kv1 (*Shaker*) und Kv4 (*Shal*) Kanalfamilie können an der Zellinnenseite sog. β -Untereinheiten (Kv β 1 und/oder Kv β 2) assoziiert sein. Diese bewirken eine beschleunigte Inaktivierung des Stromes (Rettig et al., 1994; Heinemann et al., 1996). Außerdem führt insbesondere die Assoziation der Kv β 2-Untereinheit über Chaperon-artige Effekte zu einer verstärkten Expression der Kanäle (Shi et al., 1996).

Koimmunopräzipitationsstudien haben gezeigt, daß alle bekannten Kv1 Kanäle spezifisch mit den beiden bekannten β - Untereinheiten Kv β 1 und Kv β 2 interagieren können (Nakahira et al., 1996; Rettig et al., 1994). Dabei zeigen die Kanäle Kv1.1 und Kv1.5 jedoch eine deutlich geringere Affinität zu den β -Untereinheiten.

Inaktivierungszeitkonstanten der gefundenen Ströme sind schneller, als es für die Kv1 Ströme ohne β -Untereinheiten beschrieben ist, jedoch ist die Inaktivierung viel langsamer als bei Assoziation von β -Untereinheiten zu erwarten. Dies wäre durch eine Überlagerung von sehr schnell inaktivierenden Kanälen (mit assoziierter β -Untereinheit) und langsam inaktivierenden Kanälen (ohne β -Untereinheit) zu erklären.

5.9 Posttranslationale Regulationsmechanismen

Zusätzlich zu der quantitativen Regulation der mRNA- und Proteinkonzentration in der Zelle sind eine Reihe von weiteren Regulationsmechanismen für spannungsabhängige Kaliumkanäle beschrieben worden.

Durch die Bindung von β -Untereinheiten werden nicht nur die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kv Kanäle verändert, sondern es kann auch die funktionale Expression der K^+ Kanäle auf der Zellmembran erhöht werden (Rettig et al., 1994; Nakahira et al., 1996; Shi et al., 1996). Ebenfalls ist ein Einfluß der RNA Konzentration auf elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften von Kv1 Kanälen beschrieben worden (Moran et al., 1992; Honore et al., 1992). Als Mechanismus wird die Bildung von Kaliumkanal-Suprastrukturen (Ionenkanalclustern) vermutet (Honore et al., 1992).

Außerdem sind direkte, posttranslationale Modifikationen der Kanäle zu vermuten. Attali et al., 1997 fanden in Experimenten mit kultivierten Oligodendrozyten sowie Oligodendrozytenvorläuferzellen, daß die im Western-Blot mit Kv1.5 bzw. Kv1.6 spezifischen Antikörpern erkannten Proteine eine sehr viel höhere Molmasse besaßen als nach der cDNA Sequenz zu erwarten. Dies läßt eine starke posttranslationale Modifikation der Proteine z.B. Glykosylierung und/oder Phosphorylierung vermuten. Dieses Phänomen wurde auch für andere Kv(1) Kanäle beobachtet (Scott et al., 1994; Veh et al., 1995).

Die Regulation von Ionenkanälen durch Phosphorylierung des Kanalproteins an den Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden (Holmes et al., 1996; Levitan, 1985; Übersicht s. Levitan, 1994; Hemmings et al., 1989 in Neuronen). Im Kv1-Gen ist sowohl ein Tyrosin-Kinase-"Site" in der N-terminalen Region als auch ein PKC "Site" im zytoplasmatischen Loop zwischen der S4 und der S5-Region beschrieben worden (Chandy und Gutman, 1995) und es wurden sowohl Proteinkinase C (PKC) (Timpe und Fantl, 1994) als auch Proteinkinase A (PKA) abhängige (Levin et al., 1995; Bosma et al., 1993) Mechanismen der Phosphorylierung von Kv1-Kanälen beschrieben. Timpe und Fantl (Timpe und Fantl, 1994) zeigten, daß die Aktivierung der Rezeptoren für PDGF und FGF bei Expressionsexperimenten in *Xenopus* Oozyten innerhalb von ca. 20 min zu einer signifikanten Verringerung der Kaliumströme durch Kv1.5-Kanäle führt. Dabei spielt die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C eine Rolle.

In allen Kv1-Genen befindet sich eine N-Glykosylierungssequenz im extrazellulären Loop zwischen den Transmembrandomänen S1 und S2.

Innerhalb sehr viel kürzerer Zeiten kann die Kanalaktivität u.a. durch Faktoren wie pH (Deutsch und Lee, 1989), oxidativen Zustand der Zelle ("redox state") (Ruppersberg et al., 1991) und Temperatur (Lee und Deutsch, 1990) beeinflusst werden. Die Modulation der Kaliumkanalaktivität durch die Bindung von Kalziumionen an der intrazellulären Seite des Membranmoleküls (Übersicht s. Latorre et al., 1989) sowie durch Ionen wie Na^+ (Löffler und Hunter, 1997; Howe et al., 1992) oder Protonen (Xu und Rozanski, 1997) sind bereits nachgewiesen worden.

5.10 Subzelluläre Verteilung von Kv1 Kanälen

Die überwiegende Mehrzahl der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert das Kv1.5 Protein (99 %). Die immunozytochemischen Färbungen des Kv1.5 Kanals zeigen im Unterschied zu den anderen Kv-Färbungen ein gepunktetes Färbemuster (Abb. 17 C), das nicht nur bei allen Vorläuferzellen, sondern auch auf Astrozyten beobachtet wurde. Dieses Färbemuster läßt die Kanalexpression in Form von konzentrierten Ansammlungen einzelner Kanalkomplexe in der Zellmembran (sog. Cluster) vermuten.

Die Cluster-Bildung ist ein Phänomen, das in Neuronen schon seit langem beschrieben wurde. In myelinisierten Axonen ist die Expression von Natriumkanälen auf die Bereiche der Ranvierschen Schnürringe beschränkt (Waxman und Ritchie, 1993). An den Axonen von retinalen Ganglienzellen wurde gezeigt, daß die Expression der Kanäle in Clustern durch einen löslichen Faktor induziert wird (vermutlich ein Protein mit einer Molmasse größer als 10 kD), der von Oligodendrozyten sezerniert wird (Kaplan, Meyer et al., 1997). Auch für spannungsabhängige Kaliumkanäle wurde eine Konzentration in bestimmten funktionellen Domänen beschrieben (z.B. synaptische Terminalen: Wang et al., 1994, Ranviersche Schnürringe: Wang et al., 1993, postsynaptische Membran: Alonso und Widmer, 1997; Scannevin et al., 1996).

Die Anordnung von Kv1 Kanälen auf der Zellmembran in Clustern wird durch Proteine der PSD-95

Familie von membran-assoziierten Guanylat-Kinasen vermittelt (Kim et al., 1995; Kim und Sheng, 1996). Bis jetzt gibt es jedoch noch keine Untersuchungen über die Expression dieser Moleküle in Gliazellen.

Weitere Anhaltspunkte für eine inhomogene Verteilung der Kanalmoleküle auf der Zellmembran ergaben sich bei Untersuchungen im "cell-attached" Modus der Patch-clamp-Technik. In dem unter der Patchpipette befindlichen Membranstück von ca. $1\ \mu\text{m}^2$ befanden sich häufig entweder keine aktiven Kanäle oder sehr viele (>10 Kanäle). Bei einer durchschnittlichen Gesamtzeitleitfähigkeit von 15-17 nS (bei Aktivierung der "delayed rectifier" Ströme) sollten sich bei einer Einzelkanalleitfähigkeit von 20 pS (für Kv1 Kanäle) (Chandy und Gutman, 1995) ca. 800 aktive Kanäle auf der gesamten Zellmembran befinden. Nimmt man eine spezifische Kapazität von $0,01\ \text{pF}/\mu\text{m}^2$ an (wie allgemein für Zellmembranen angegeben, Sherman-Gold, 1993) ergibt sich bei einer gemessenen Kapazität von 8 pF eine Membranfläche von $800\ \mu\text{m}^2$. Bei einer homogenen Verteilung der Kanäle sollte sich also in jedem "cell-attached" Patch von ca. $1\ \mu\text{m}^2$ Fläche ein aktiver Einzelkanal befinden.

Als Auswirkung einer möglichen Ausbildung von Kanalaggregaten auf der Zellmembran ist eine Veränderung der elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der aggregierten Kanäle möglich. Die Expression von Strömen mit veränderten Eigenschaften in Abhängigkeit von der mRNA Konzentration wurde bereits beschrieben (Honore et al., 1992; Moran et al., 1992). In Expressionsexperimenten mit *Xenopus* Oozyten fanden Honore et al. (Honore et al., 1992), daß die Injektion von geringen Mengen Kv1.3-mRNA zu schnell inaktivierenden Kaliumströmen mit einer hohen Sensitivität gegenüber dem Kaliumkanalblocker Charybdotoxin (CTX) führt, während bei Injektion derselben mRNA in hohen Konzentrationen ein nicht inaktivierender Kaliumstrom exprimiert wird, der nur eine geringe CTX-Sensitivität aufweist. Dieser Effekt wird durch die Zerstörung des Zytoskeletts unterdrückt. Anhand dieser Daten wird bei großen mRNA-Mengen die Bildung von Kaliumkanal-Suprastrukturen (Ionenkanal-Cluster) in Assoziation mit dem Zytoskelett vermutet, in denen sich die Eigenschaften der Kanäle verändern.

Kv1 Kanäle in Schwannzellen zeigen eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung (Mi et al., 1995). Kv1.5 wird in diesen Zellen vorwiegend an den Ranvierschen Schnürringen und an den Außenseiten der Myelinstapel exprimiert, Kv1.1 Kanäle dagegen wurden vorwiegend in den intrazellulären und perinukleären Kompartments gefunden (Mi et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Kv1.4 Molekülen vorwiegend in den Haupt-Ausläufern der Zellen beobachtet. Eine analoge subzelluläre Verteilung wurde auch in anderen Zellen beobachtet. Es ist gezeigt worden (Sewing et al., 1996), daß Kv1.4 in vitro spezifisch in das basolaterale Kompartiment von MDCK-Zellen transportiert wird, welches im allgemeinen als das Äquivalent des axonalen Kompartments in Neuronen angesehen wird.

5.11 Expression von diversen Kv1 Transkript-Kombinationen

Die Expression der Kv1-Transkripte wurde durch Einzelzell-RT-PCR-Analyse untersucht. Dabei wurde eine sehr heterogene Expression von Kv1 Transkripten gefunden. Es wurde gezeigt, daß in den meisten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mehrere Kv1-Gene gleichzeitig aktiv sind. Dies stimmt mit Befunden von Attali et al. (Attali et al., 1997) überein, die in Rattenoligodendrozyten die Expression von vier verschiedenen Kv1 Transkripten (Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6) fanden.

Die sehr heterogene Transkriptexpression zeigte keine Korrelation mit den elektrophysiologischen Eigenschaften der K^+ Ströme. Es gibt offensichtlich auf der mRNA und Proteinebene unterschiedliche Regulationsmechanismen für Kv1 Kanäle.

5.12 Shaker- Kaliumkanal-Transkripte und -proteine werden auf unterschiedliche Weise reguliert

Die immunozytochemischen Untersuchungen sowie die Einzelzell-RT-PCR-Experimente zeigen Unterschiede in der Protein- und Transkriptexpression der Kv1 Kanäle.

Die relative Häufigkeit der Expression der unterschiedlichen Kv1 Transkripte und Proteine in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

	<i>Transkripthäufigkeit</i> -mRNA vorhanden-	<i>Häufigkeit der Proteinexpression</i> -Anteil positiv gefärbter Zellen-
Kv1.1	5,9 % (n=17)	9,6 % (n= 1839)
Kv1.2	64,7 % (11/17, n=17)	0,9 % (n= 529)
Kv1.3	29,4 % (5/17)	1,0 % (n= 597)
Kv1.4	23,5 % (4/17)	84,6 % (n= 525)
Kv1.5	52,9 % (9/17)	98,6 % (n= 635)
Kv1.6	58,8 % (10/17)	99,3 % (n= 1055)

Tabelle 4
Häufigkeit der Expression von Kv1 Transkripten bzw. Proteinen

Die Transkripte der in der Mehrzahl der Zellen exprimierten Proteine (Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6) wurden nicht in allen Zellen nachgewiesen. Die Zahl der mRNA Kopien in der Zelle ist nicht sehr groß (ca. 10-100). Diese können durch eine Einzelzell-PCR nicht immer vollständig erfaßt werden (z.B. durch nicht vollständiges Ernten des Zytoplasmas).

Nicht alle exprimierten Transkripte wurden auch auf Proteinebene gefunden. Kv1.2 und Kv1.3 Transkripte wurden relativ häufig (65 % bzw. 30 % der Zellen) gefunden, das Protein wurde jedoch nicht exprimiert.

Über die Transkription der Kv1 Gene sowie die Stabilität der mRNA ist bisher wenig bekannt. Die kodierende Region der Kv1 Proteine ist ungefähr 1500 bis 2000 Basenpaare lang, die mRNAs können jedoch mit 11000 Basenpaaren sehr viel länger sein (Beckh und Pongs, 1990, Chandy et al., 1990). Die nichtkodierenden Sequenzen sind bis jetzt nur im Kv1.4 Gen untersucht worden (Wymore et al., 1996; Wymore et al., 1994). In diesen Bereichen wurden verschiedene Regulationselemente (Chandy et al., 1990; Wymore et al., 1994) gefunden, die die mRNA-Stabilität verändern können (z.B. AUUA-Motive, die eine reduzierte mRNA Stabilität bewirken). Durch alternatives Splicing oder die Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsstops können somit mRNAs entstehen, die mit unterschiedlicher Effektivität translatiert werden (Wymore et al., 1996). In der 3' nichtkodierenden Region des Kv1.4-Gens befinden sich viele evolutionär konservierte AT-reiche Motive, die die mRNA-Stabilität, die Translation und den Transport vom Kern ins Zytoplasma regulieren können (Duret et al., 1993). Da sich in der GC reichen Promotorregion zahlreiche potentielle Methylierungsstellen befinden, ist ebenfalls eine Inaktivierung der Genexpression durch Methylierung möglich (Wymore et al., 1996). Die 5' nichtkodierende Region des Kv1.4-Gens enthält mehrere Translationsinitiationssequenzen (Kozak, 1991).

Die Synthese von Kaliumkanalproteinen kann durch verschiedene Faktoren wie die Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren (PDGF: Timpe und Fantl, 1994) oder Veränderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration (Jonas und Kaczmarek, 1996) reguliert werden.

Eine nicht übereinstimmende Regulation von mRNA und Protein wurde auch in anderen Zellsystemen beobachtet. So untersuchten Xu et al., 1996 in Herzmuskelzellen der Ratte die entwicklungsabhängige Regulation von spannungsabhängigen K⁺ Kanälen und fanden eine z.T. gegenläufige Entwicklung der Protein- und RNA-Mengen. Die Kv2.1mRNA wird z.B. während der ersten 20 Tage nach Geburt stark hochreguliert, während die Proteinexpression verringert wird.

5.13 Funktionelle Rolle von Kv1 Kanälen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Setzt man Oligodendrozyten-Vorläuferzellen für längere Zeit Kaliumkanalblockern wie 4-AP oder TEA aus, so führt dies zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate dieser Zellen und zur Verhinderung der Ausdifferenzierung (auf den Stadium) der O4-positiven Vorläuferzellen (Knutson et al., 1997). Als Mechanismus wird die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration durch die Aktivierung von Glutamatrezeptoren vermutet. Es wird vermutet, daß andere Signale, die die Proliferation von Vorläuferzellen beeinflussen, auf ähnliche Weise die Aktivität der Kaliumkanäle regulieren.

Andererseits konnte in Rattenoligodendrozyten mit Antisense-Experimenten, die spezifisch die Expression des Kv1.5 Kanals hemmen, kein Einfluß auf die Proliferationsrate der Zellen festgestellt werden (Attali et al., 1997).

5.14 Spannungsaktivierte K^+ Kanäle werden durch die Aktivierung des GABA_A-Rezeptors geblockt

Auswärts rektifizierende Kaliumkanäle von kultivierten Körnerzellen werden durch die Aktivierung des GABA_A Rezeptors reguliert. In diesen Zellen führt die Rezeptoraktivierung nicht nur zur Aktivierung eines Chloridkanals, sondern ebenfalls zur Blockierung von K^+ Strömen (Labrakakis et al., 1997). Durch Patch-Clamp-Experimente im Ganzzellmodus konnte gezeigt werden, daß sowohl schnell inaktivierende A-Typ-Ströme als auch nicht inaktivierende Ströme vom delayed rectifier Typ durch GABA-Applikation gehemmt werden. Um die blockierten Kanäle weiter zu charakterisieren, wurden Einzelkanalexperimente im "cell-attached" Modus der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Dabei kann die Reaktion eines einzelnen K^+ Kanals einer vollständig intakten Zelle bei Applikation von GABA beobachtet werden (s.Abb. 27). Da der auf diese Weise registrierte Kanal nicht direkt mit der GABA-haltigen Lösung in Kontakt kommt, ist eine Beteiligung von intrazellulären Mechanismen anzunehmen. Die Natur dieser Mechanismen ist derzeit noch unklar.

Analoge Mechanismen sind insbesondere für die Aktivierung von Rezeptoren für exzitatorische Neurotransmitter beschrieben worden, z.B. ist eine Blockierung von K^+ Kanälen bei der Aktivierung des Kainatrezeptors in Bergmanngliazellen (Müller et al., 1992) und in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen beschrieben worden (Borges und Kettenmann, 1995). Als Mechanismus für die intrazelluläre Signalweiterleitung werden bei den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Einstrom von Na^+ Ionen durch das Rezeptormolekül (Borges und Kettenmann, 1995) und bei Bergmanngliazellen der Einstrom von Ca^{2+} Ionen (Müller et al., 1992) genannt. Da der GABA_A-Rezeptor jedoch weder für Na^+ noch für Ca^{2+} permeabel ist, sollte bei den untersuchten Zellen ein anderer Mechanismus zutreffend sein.

Ein Block von K^+ Kanälen durch die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren ist auch in anderen Zellsystemen beschrieben worden, z.B. Bergmann Gliazellen des Kleinhirns (Müller et al., 1994).

5.15 Die Blockade von K^+ Kanälen verstärkt die Depolarisation

Im reifen ZNS wird GABA als der hauptsächlich inhibitorische Neurotransmitter angesehen, d.h. das postsynaptische Neuron reagiert auf die Ausschüttung von GABA mit einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Für einige neonatale Neuronen ist jedoch auch eine depolarisierende Wirkung von GABA beschrieben worden. Die Art dieser Reaktion hängt von der intrazellulären Chloridkonzentration ab. Da im Ganzzellmodus der Patch-Clamp-Konfiguration die intrazelluläre Cl^- Konzentration durch die Pipettenlösung vorgegeben ist, wurden Experimente im cell-attached Modus mit dem Ionophor Gramicidin in der Pipette durchgeführt, um zu testen, ob die Zelle bei der natürlich vorkommenden Chloridkonzentration depolarisiert oder hyperpolarisiert wird. Auch unter diesen Bedingungen führte die Applikation von GABA bei kultivierten Körnerzellen zu einer Depolarisierung des Ruhemembranpotentials. Die Depolarisation von Körnerzellen durch GABA wurde sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in Anwesenheit des K^+ Kanalblockers Ba^{2+} (10 mM) beobachtet, war jedoch in Abwesenheit des Blockers viel stärker. Aufgrund der K^+ Verteilung (hohe intrazelluläre K^+ Konzentration) und der fast ausschließlichen K^+ Leitfähigkeit der Zellen ist nach der Nernst-Gleichung durch einen Ausstrom von K^+ Ionen eine Verringerung des Ruhemembranpotentials zu erwarten.

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen, pharmakologischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Kaliumkanäle auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen keine homogene Population bilden.

In Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit alle 6 bis jetzt bekannten Kv1 Transkripte sowie die Expression von 3 Kv1 Proteinen gefunden. Diese heterogene Kanalexpression führt jedoch nicht zu Unterschieden der elektrophysiologischen Parameter.

Die Aktivität von Kaliumkanälen hat einen Einfluß auf die Zellproliferation. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß diese Kanäle durch die Aktivierung von Neurotransmitterrezeptoren reguliert werden.

6 Zusammenfassung

Auswärts rektifizierende Kaliumkanäle bestimmen die Membranleitfähigkeit von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, während reife Oligodendrozyten passive, nicht spannungsabhängige Kaliumkanäle exprimieren. Die Aktivität dieser Kanäle beeinflusst die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von spannungsaktivierbaren Kaliumkanälen des Kv1-Typs (*Shaker*-Typ) in kultivierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen anhand der Transkriptexpression, der Expression von Kv1-Proteinen und der elektrophysiologischen und pharmakologischen Analyse der Membranströme untersucht.

Auf mRNA Ebene wurden unterschiedliche Kombinationen von Kv1.1, Kv1.4; Kv1.5 und Kv1.6 Transkripten gefunden. Ebenfalls wurde in einigen Zellen eine signifikante Menge an Kv1.2 und Kv1.3 Transkripten gefunden. Die Heterogenität der Transkriptexpression konnte nicht mit Unterschieden in den elektrophysiologischen Eigenschaften korreliert werden.

Die Expression der Kv1 Proteine wurde mit Hilfe von immunozytochemischen Färbungen mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen die Kanäle Kv1.1 bis Kv1.6 untersucht. Alle Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimierten die Kanäle Kv1.4 (95% der Zellen), Kv1.5 (99 %) und Kv1.6 (99 %), Kv1.1 Proteine wurden von 10 % der Zellen gebildet.

Um den funktionellen Beitrag der Kv1 Kanäle zum Gesamtzellstrom zu bestimmen, wurde die Stromaktivierung und -inaktivierung sowie die Sensitivität der Ströme gegen die spezifischen Kaliumkanalblocker getestet. Dabei wurden durch TEA (1-100 mM), 4-AP (0,125-1 mM) und Chinidin (5-100 μ M) jeweils ein großer Teil der Ströme gehemmt, durch CTX, DTX und MCDP wurde die Kanalaktivität nicht beeinflusst.

Um den Beitrag der Kanalproteine Kv1.4 bzw. Kv1.1 zu den elektrophysiologischen Eigenschaften des Gesamtzellstromes zu testen, wurden an einzelnen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen kombinierte elektrophysiologische Untersuchungen und immunozytochemische Färbungen durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kv1.4/Kv1.4 positiven und Kv1.1/Kv1.4 negativen Zellen festgestellt werden.

Aus den Untersuchungen ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

- 1) Oligodendrozyten exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Kv1 Transkripte.
- 2) Die überwiegende Mehrzahl der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimieren die Kv1 Proteine Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6.
- 3) Der Gesamtzellstrom kann vorwiegend durch Kv1.5 Kanäle oder durch eine Kombination von Kv1.4/Kv1.6 Kanälen sowie durch Mitglieder anderer Familien spannungsabhängiger Kaliumkanäle getragen werden.

Um zu untersuchen, ob spannungsabhängige Kaliumkanäle durch die Aktivierung von inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren beeinflusst werden, wurden kultivierte Körnerzellen als Modellsystem verwendet, da diese eine hohe Dichte an Kv Kanälen sowie an GABA Rezeptoren exprimieren. Im "cell-attached" Modus der Patch-Clamp-Technik wurde die Reaktion von einzelnen auswärts rektifizierenden Kaliumkanälen während der GABA-Antwort untersucht. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, daß die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle während der Reaktion der Zelle auf GABA stark zurückgeht. Da Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ebenfalls GABA_A-Rezeptoren exprimieren, ist anzunehmen, daß deren Aktivierung über einen analogen Mechanismus zur Blockierung von Kaliumkanälen führt.

Literatur

- Alonso und Widme, 1997 Alonso, G. und Widmer, H. Clustering of KV4.2 potassium channels in postsynaptic membrane of rat supraoptic neurons: an ultrastructural study. *Neuroscience* 77 1997 617-621
- Attali et al., 1997 Attali, B.; Wang, N.; Kolot, A.; Sobko, A.; Cherepanov, V. und Soliven, B. Charakterization of delayed rectifier Kv channels in oligodendrocytes and progenitor cells. *J. Neurosci.* 17 1997 (2) Nov. 1 8234-8245
- Attali et al., 1992 Attali, B.; Romey, G.; Honore, E.; Schmid-Alliana, A.; Mattei, M.G.; Lesage, F.; Ricard, P.; Barhanin, J. und Lazdunski, M. Cloning, functional expression, and regulation of two K⁺ channels in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 267 1992 (12) Apr. 25 8650-7
- Bansal et al., 1989 Bansal, R.; Warrington, A.E.; Gard, A.L.; Ranscht, B. und Pfeiffer, S.E. Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J. Neurosci. Res.* 24 1989 (4) Dec. 548-57
- Bansal und Pfeiffer, 1992 Bansal, R. und Pfeiffer, S.E. Novel stage in the oligodendrocyte lineage defined by reactivity of progenitors with R-mAb prior to O1 anti-galactocerebroside. *J. Neurosci. Res.* 32 1992 (3) Jul. 309-16
- Barish, 1991 Barish, M.E. Increases in intracellular calcium ion concentration during depolarization of cultured embryonic *Xenopus* spinal neurones. *J. Physiol. Lond.* 444 1991 Dec. 545-65
- Barish, 1986 Barish, M.E. Differentiation of voltage-gated potassium current and modulation of excitability in cultured amphibian spinal neurones. *J. Physiol. Lond.* 375 1986 Jun. 229-50
- Barres et al., 1990a Barres, B.A., Koroshetz, W.J., Swartz, K.J., Chun, L.L.Y. und Corey, D.P. Ion channel expression by white matter glia: The O-2A glial progenitor cell. *Neuron* 4 1990a 507-524
- Barres et al., 1990b Barres, B.A.; Koroshetz, W.J.; Chun, L.L. und Corey, D.P. Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron* 5 1990b (4) Oct. 527-44
- Barres et al., 1990c Barres, B.A.; Chun, L.L. und Corey, D.P. Ion channels in vertebrate glia. *Annu. Rev. Neurosci.* 13 1990c 441-74
- Barres et al., 1992 Barres, B.A.; Hart, I.K.; Coles, H.S.; Burne, J.F.; Voyvodic, J.T.; Richardson, W.D. und Raff, M.C. Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J. Neurobiol.* 23 1992 (9) Nov. 1221-30
- Barres et al., 1993 Barres, B.A.; Schmid, R.; Sendtner, M. und Raff, M.C. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118 1993 (1) May 283-95
- Barres und Raff, 1993 Barres, B.A. und Raff, M.C. Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 361 1993 (6409) Jan. 21 258-60
- Beckh und Pongs, 1990 Beckh, S.; Pongs, O. Members of the RCK potassium channel family are differentially expressed in the rat nervous system. *EMBO J.* 9 1990 (3) Mar. 777-82
- Berger et al., 1991 Berger, T.; Schnitzer, J. und Kettenmann, H. Developmental changes in the membrane current pattern, K⁺ buffer capacity, and morphology of glial cells in the corpus callosum slice. *J. Neurosci.* 11 1991 (10) Oct. 3008-24
- Berger et al., 1992 Berger, T.; Walz, W.; Schnitzer, J. und Kettenmann, H. GABA- and glutamate-activated currents in glial cells of the mouse corpus callosum slice. *J. Neurosci. Res.* 31 1992 (1) Jan. 21-7
- Berger, 1995 Berger, T. AMPA-type glutamate receptors in glial precursor cells of the rat corpus callosum: ionic and pharmacological properties. *Glia.* 14 1995 (2) Jun. 101-14
- Bertoli et al., 1994 Bertoli, A., Moran, O., und Conti, F. Activation and deactivation properties of rat

- brain K⁺ channels of the Shaker-related subfamily. *Eur.Biophys.J.* 23 1994 379-384
- Bertoli et al., 1996 Bertoli, A., Moran, O., und Conti, F. Accumulation of long-lasting inactivation in rat brain K⁺ channels. *Exp.Brain Res.* 110 1996 401-412
- Bjartmar et al., 1994 Bjartmar, C.; Hildebrand, C. und Loinder, K. Morphological heterogeneity of rat oligodendrocytes: electron microscopic studies on serial sections. *Glia* 11 1994 (3) *Jul.* 235-44
- Borges et al., 1994 Borges, K.; Ohlemeyer, C.; Trotter, J. und Kettenmann, H. AMPA/kainate receptor activation in murine oligodendrocyte precursor cells leads to activation of a cation conductance, calcium influx and blockade of delayed rectifying K⁺ channels. *Neuroscience* 63 1994 (1) *Nov.* 135-49
- Borges et al., 1995 Borges, K.; Wolswijk, G.; Ohlemeyer, C. und Kettenmann, H. Adult rat optic nerve oligodendrocyte progenitor cells express a distinct repertoire of voltage- and ligand-gated ion channels. *J. Neurosci. Res.* 40 1995 (5) *Apr.* 1 591-605
- Borges und Kettenmann, 1995 Borges, K. und Kettenmann, H. Blockade of K⁺ channels induced by AMPA/kainate receptor activation in mouse oligodendrocyte precursor cells is mediated by Na⁺ entry. *J. Neurosci. Res.* 42 1995 (4) *Nov.* 1 579-93
- Bosma et al., 1993 Bosma, M.M.; Allen, M.L.; Martin, T.M. und Tempel, B.L. PKA-dependent regulation of mKv1.1, a mouse Shaker-like potassium channel gene, when stably expressed in CHO cells. *J. Neurosci.* 13 1993 (12) *Dec.* 5242-50
- Bottenstein und Sato, 1979 Bottenstein, J.E. und Sato, G.H. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 1979 (1) *Jan.* 514-7
- Brahmajothi et al., 1997 Brahmajothi, M.V.; Morales, M.J.; Rasmusson, R.L.; Campbell, D.L. und Strauss, H.C. Heterogeneity in K⁺ channel transcript expression detected in isolated ferret cardiac myocytes. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 20 1997 (2 Pt 2) *Feb.* 388-96
- Butt und Ranson, 1989 Butt, A.M. und Ranson, B.R. Visualisation of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat otic nerve by intracellular injection of Lucifer yellow and horseradish peroxidase. *Glia* 2 1989 470-475
- Butt und Tutton, 1992 Butt, A.M. und Tutton, M. Response of oligodendrocytes to glutamate and gamma-aminobutyric acid in the intact mouse optic nerve. *Neurosci. Lett.* 146 1992 (1) *Oct.* 26 108-10
- Cameron und Rakic, 1991 Cameron, R.S. und Rakic, P. Glial Cell Lineage in the Cerebral Cortex: A Review and Synthesis. *Glia* 4 1991 124-137
- Cameron-Curry und Le-Douarin, 1995 Cameron-Curry, P. und Le-Douarin, N.M. Oligodendrocyte precursors originate from both the dorsal and the ventral parts of the spinal cord. *Neuron* 15 1995 (6) *Dec.* 1299-310
- Catterall, 1988 Catterall, W.A. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242 1988 (4875) *Oct.* 7 50-61
- Chandy et al., 1990 Chandy, K.G.; Williams, C.B.; Spencer, R.H.; Aguilar, B.A.; Ghanshani, S.; Tempel, B.L. und Gutman, G.A. A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions. *Science* 247 1990 (4945) *Feb.* 23 973-5
- Chandy und Gutman, 1995 Chandy, K.G. und Gutman, G.A. Voltage-gated K⁺ channels. North, A. *Handbook of Receptors and Channels: Ligand and Voltage-gated Ion Channels* 1995 Boca Raton, FL CRC Press 1995
- Chen und DeVries, 1989 Chen, S.J. und DeVries, G.H. Mitogenic effect of axolemma-enriched fraction on cultured oligodendrocytes *J. Neurochem.* 52 1989 (1) *Jan.* 325-7
- Chomczynski, 1993 Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15 1993 (3) *Sep.* 532-4
- Connor und Stevens, 1971a Connor, J.A. und Stevens, C.F. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol. Lond.* 213 1971a (1) *Feb.*

- Connor und Stevens, 1971b Connor, J.A. und Stevens, C.F. Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. *J. Physiol. Lond.* 213 1971b (1) *Feb.* 1-19
- Curtis et al., 1988 Curtis, R.; Cohen, J.; Fok-Seang, J.; Hanley, M.R.; Gregson, N.A.; Reynolds, R. und Wilkin, G.P. Development of macroglial cells in rat cerebellum. I. Use of antibodies to follow early in vivo development and migration of oligodendrocytes. *J. Neurocytol.* 17 1988 (1) *Feb* 43-54
- Deber und Reynolds, 1991 Deber, C.M. und Reynolds, S.J. Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clin. Biochem.* 24 1991 (2) *Apr.* 113-34
- DeVries et al., 1983 DeVries, G.H.; Minier, L.N. und Lewis, B.L. Further studies on the mitogenic response of cultured Schwann cells to rat CNS axolemma-enriched fractions. *Brain Res.* 285 1983 (1) *Jul.* 87-93
- Deutsch und Lee, 1989 Deutsch, C. und Lee, S.C. Modulation of K⁺ currents in human lymphocytes by pH. *J. Physiol. Lond.* 413 1989 *Jun.* 399-413
- Deutsch und Chen, 1993 Deutsch, C. und Chen, L.Q. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 1993 (21) *Nov.* 1 10036-40
- Duret et al., 1993 Duret, L., Dorkel, F. und Gautier, C. Strong conservation of non-coding sequences during vertebrate evolution: Potential involvement in post-transkriptional regulation of gene expression. *Nucleic Acids Res.* 21 1993 2315-2322
- Eisenbarth et al., 1979 Eisenbarth, G.S.; Walsh, F.S. und Nirenberg, M. Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 1979 4913-4917
- Fanarraga et al., 1995 Fanarraga, M.L., Sommer, I. und Griffiths, I.R. O-2A progenitors of the mouse optic nerve exhibit a developmental pattern of antigen expression different from the rat. *Glia* 15 1995 95-104
- Fedida, 1997 Fedida, D. Gating charge and ionic currents associated with quinidine block of human Kv1.5 delayed rectifier channels. *J. Physiol. Lond.* 499 1997 (Pt 3) *Mar.* 15 661-75
- Fok und Miller, 1994 Fok-Seang, J. und Miller, R.H. Distribution and differentiation of A2B5+ glial precursors in the developing rat spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 37 1994 (2) *Feb.* 1 219-35
- Gallo und Russell, 1995 Gallo, V. und Russell, J.T. Excitatory amino acid receptors in glia: different subtypes for distinct functions? *J. Neurosci. Res.* 42 1995 (1) *Sep.* 1 1-8
- Gallo et al., 1996 Gallo, V.; Zhou, J.M.; McBain, C.J.; Wright, P.; Knutson, P.L. und Armstrong, R.C. Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *J. Neurosci.* 16 1996 (8) *Apr.* 15 2659-2670
- Gansmüller et al., 1991 Gansmüller, A.; Clerin, E.; Kruger, F.; Gumpel, M. und Lachapelle, F. Tracing transplanted oligodendrocytes during migration and maturation in the shiverer mouse brain. *Glia* 4 1991 (6) 580-90
- Goldmann et al., 1984 Goldmann, J.E.; Hirano, M.; Yu, R.K. und Seyfried, T.N. GD3 ganglioside is a glycolipid of immature neuroectodermal cells. *J. Neuroimmunol.* 7 1984 179-192
- Griffiths et al., 1995 Griffiths, I.R.; Montague, P. und Dickinson, P. The proteolipid protein gene. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 21 1995 (2) *Apr.* 85-96
- Grissmer et al., 1990 Grissmer, S.; Dethlefs, B.; Wasmuth, J.J.; Goldin, A.L.; Gutman, G.A.; Cahalan, M.D. und Chandy, K.G. Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 1990 (23) *Dec.* 9411-5
- Grissmer et al., 1994 Grissmer, S.; Nguyen, A.N.; Aiyar, J.; Hanson, D.C.; Mather, R.J.; Gutman, G.A.; Karmilowicz, M.J.; Auperin, D.D. und Chandy, K.G. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed

- in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* 45 1994 (6) *Jun.* 1227-34
- Gurantz et al., 1996 Gurantz, D., Ribera, A.B. und Spitzer, N.C.
- Temporal regulation of Shaker- and Shab-like Potassium channel gene expression in single embryonic spinal neurons during K⁺ current development. *J. Neurosci.* 16 1996 (10) 3287-3295
- Hamill et al., 1981 Hamill, O.P. , Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high- resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391 1981 85-100
- Hardy und Reynolds, 1991 Hardy, R. und Reynolds, R. Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development* 111 1991 (4) *Apr.* 1061-80
- Heinemann et al., 1996 Heinemann, S.H.; Rettig, J.; Graack, H.R. und Pongs, O. Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *J. Physiol. Lond.* 493 1996 (Pt 3) *Jun.* 15 625-33
- Hemmings et al., 1989 Hemmings, H.C. Jr; Nairn, A.C.; McGuinness, T.L.; Huganir, R.L. und Greengard, P. Role of protein phosphorylation in neuronal signal transduction. *FASEB J.* 3 1989 (5) *Mar.* 1583-92
- Henderson et al., 1984 Henderson, L.P.; Smith, M.A. und Spitzer, N.C. The absence of calcium blocks impulse-evoked release of acetylcholine but not de novo formation of functional neuromuscular synaptic contacts in culture. *J. Neurosci.* 4 1984 (12) *Dec.* 3140-50
- Hildebrand et al., 1993 Hildebrand, C.; Remahl, S.; Persson, H. und Bjartmar, C. Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 40 1993 (3) *Mar.* 319-84
- Hildebrand et al., 1994 Hildebrand, C.; Bowe, C.M. und Remahl, I.N. Myelination and myelin sheath remodelling in normal and pathological PNS nerve fibres. *Prog. Neurobiol.* 43 1994 (2) *Jun.* 85-141
- Hille, 1992 Hille, B. Ionic channels in excitable membranes. 2nd ed. Sunderland, Mass. Sinauer Associates, Inc. 1992
- Hoffman et al., 1997 Hoffman, D.A.; Magee, J.C.; Colbert, C.M. und Johnston, D. K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387 1997 (6636) *Jun.* 26 869-75
- Holliday und Spitzer, 1993 Holliday, J. und Spitzer, N.C. Calcium regulates neuronal differentiation both directly and via co-cultured myocytes. *J. Neurobiol.* 24 1993 (4) *Apr.* 506-14
- Holmes et al., 1996 Holmes, T.C.; Fadool, D.A.; Ren, R. und Levitan, I.B. Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science* 274 1996 (5295) *Dec.* 20 2089-91
- Honore et al., 1992 Honore, E., Attali, B., Romey, G., Lesage, F., Barhanin, J. and Lazdunski, M.
- Different types of K⁺ channel current are generated by different levels of a single mRNA. *EMBO J.* 11 1992 (7) 2465-2471
- Hopkins et al., 1994 Hopkins, W.F.; Allen, M.L.; Houamed, K.M. und Tempel, B.L. Properties of voltage-gated K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes by mKv1.1, mKv1.2 and their heteromultimers as revealed by mutagenesis of the dendrotoxin-binding site in mKv1.1. *Pflügers Arch.* 428 1995 (3-4) *Oct.* 382-90
- Hoshi et al., 1991 Hoshi, T.; Zagotta, W.N. und Aldrich, R.W. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7 1991 (4) *Oct.* 547-56
- Hoshi et al., 1990 Hoshi, T.; Zagotta, W.N. und Aldrich, R.W. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250 1990 (4980) *Oct.* 26 533-8
- Howe et al., 1992 Howe, J.R.; Baker, M. und Ritchie, J.M. On the block of outward potassium current in rabbit Schwann cells by internal sodium ions. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 249 1992

- Inoue et al., 1996 Inoue, K.; Osaka, H.; Sugiyama, N.; Kawanishi, C.; Onishi, H.; Nezu, A.; Kimura, K.; Yamada, Y. und Kosaka, K. A duplicated PLP gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease detected by comparative multiplex PCR. *Am. J. Hum. Genet.* 59 1996 (1) *Jul.* 32-9
- Jabs et al., 1994 Jabs, R.; Kirchhoff, F.; Kettenmann, H. und Steinhauser, C. Kainate activates Ca(2+)-permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K⁺ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflügers Arch.* 426 1994 (3-4) *Feb.* 310-9
- Jonas und Kaczmarek, 1996 Jonas, E.A. und Kaczmarek, L.K. Regulation of potassium channels by protein kinases. *Curr-Opin-Neurobiol.* 6 1996 (3) *Jun.* 318-23
- Jones und Ribera, 1994 Jones, S.M. und Ribera, A.B. Overexpression of a potassium channel gene perturbs neural differentiation. *J. Neurosci.* 14 1994 (5) *Apr.* 15 2789-2799
- Jones et al., 1995 Jones, S.M.; Hofmann, A.D.; Lieber, J.L. und Ribera, A.B. Overexpression of potassium channel RNA: In vivo development rescues neurons from suppression of morphological differentiation in vitro. *J. Neurosci.* 15 1995 (4) *Apr.* 15 2867-2874
- Jung et al., 1996 Jung, M.; Sommer, I.; Schachner, M. und Nave, K.A. Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice. *J. Neurosci.* 16 1996 (24) *Dec.* 15 7920-9
- Kamb et al., 1987 Kamb, A.; Iverson, L.E. und Tanouye, M.A. Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* 50 1987 (3) *Jul.* 31 405-13
- Kaplan et al., 1997 Kaplan, M.R., Meyer, F.A., Lambert, S., Bennett, V., Duncan, I.D., Levinson, S.R., und Barres, B.A. Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* 386 1997 724-728
- Keilhauer et al., 1985 Keilhauer, G.; Meier, D.H.; Kuhlmann-Krieg, S.; Nieke, J. und Schachner, M. Astrocytes support incomplete differentiation of an oligodendrocyte precursor cell. *EMBO J.* 4 1985 (10) *Oct.* 2499-504
- Kettenmann et al., 1984 Kettenmann, H.; Orkand, R.K. und Lux, H.D. Some properties of single potassium channels in cultured oligodendrocytes. *Pflügers Arch.* 400 1984 (3) *Mar.* 215-21
- Kettenmann et al., 1991 Kettenmann, H.; Blankenfeld, G.V. und Trotter, J. Physiological properties of oligodendrocytes during development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633 1991 64-77
- Kim et al., 1995 Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y.N., und Sheng, M. Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378 1995 85-88
- Kim und Sheng, 1996 Kim, E. und Sheng, M. Differential K⁺ channel clustering activity of PSD-95 and SAP97, two related membrane-associated putative guanylate kinases. *Neuropharmacology* 35 1996 (7) 993-1000
- Kirsch et al., 1991 Kirsch, G.E.; Drewe, J.A.; Verma, S.; Brown, A.M. und Joho, R.H. Electrophysiological characterization of a new member of the RCK family of rat brain K⁺ channels. *FEBS Lett.* 278 1991 (1) *Jan.* 14 55-60
- Klumpp et al., 1991 Klumpp, D.J.; Farber, D.B.; Bowes, C.; Song, E.J. und Pinto, L.H. The potassium channel MBK1 (Kv1.1) is expressed in the mouse retina. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11 1991 (6) *Dec.* 611-22
- Knutson et al., 1997 Knutson, P.; Ghiani, C.A., Zhou, J.-M., Gallo, V. und McBain, C.J. K⁺ channel expression and cell proliferation are regulated by intracellular sodium and membrane depolarization in oligodendrocyte progenitor cells. *J. Neurosci.* 17 1997 (8) *Apr.* 15 2669-2682
- Kotewicz et al., 1985 Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Driftmier, K.M., Blodgett, K.P. und Gerard, G.F. Cloning and overexpression of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 35 1985 249-258

- Kozak, 1991 Kozak, M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115 1991 887-903
- Kuhlmann et al., 1988 Kuhlmann-Krieg, S.; Sommer, I. und Schachner, M. Ultrastructural features of cultured oligodendrocytes expressing stage-specific cell-surface antigens. *Brain-Res.* 467 1988 (2) *Apr.* 1 269-280
- Labrakakis et al., 1997 Labrakakis, C.; Muller, T.; Schmidt, K. und Kettenmann, H. GABAA receptor activation triggers a Cl⁻ conductance increase and a K⁺ channel blockade in cerebellar granule cells. *Neuroscience* 79 1997 (1) *Jul.* 177-89
- Lamboleze et al., 1992 Lamboleze, B., Audinat, E., Bochet, P. Crepel, F. und Rossier, J. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9 1992 247-258
- Latorre et al., 1989 Latorre, R.; Oberhauser, A.; Labarca, P. und Alvarez, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 51 1989 385-99
- Le et al., 1996 Le, M.S., Sewing, S., Coudrier, E., Elalouf, J.M., Pongs, O., und Merot, J. Polarized targeting of a shaker-like (A-type) K⁺-channel in the polarized epithelial cell line MDCK. *Mol.Membr.Biol.* 13 1996 143-147
- Lee und Deutsch, 1990 Lee, S.C. und Deutsch, C. Temperature dependence of K(+) - channel properties in human T- lymphocytes. *Biophys. J.* 57 1990 (1) *Jan.* 49-62
- Lee et al., 1994 Lee, T.E.; Philipson, L.H.; Kuznetsov, A. und Nelson, D.J. Structural determinant for assembly of mammalian K⁺ channels. *Biophys. J.* 66 1994 (3 *Pt 1*) *Mar.* 667-73
- Lee et al., 1996 Lee, T.E.; Philipson, L.H. und Nelson, D.J. N-type inactivation in the mammalian Shaker K⁺ channel Kv1.4. *J. Membr. Biol.* 151 1996 (3) *Jun.* 225-235
- LeGuern et al., 1997 LeGuern, E.; Gouider, R.; Mabin, D.; Tardieu, S.; Birouk, N.; Parent, P.; Bouche, P. und Brice, A. Patients homozygous for the 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Ann. Neurol.* 41 1997 (1) *Jan.* 104-8
- Lepple-Wienhues et al., 1996 Lepple-Wienhues, A.; Berweck, S.; Bohmig, M.; Leo, C.P.; Meyling, B.; Garbe, C. und Wiederholt, M. K⁺ channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J. Membr. Biol.* 151 1996 (2) *May* 149-57
- Levi et al., 1984 Levi, G.; Aloisi, F.; Ciotti, M.T. und Gallo, V. Autoradiographic localization and depolarization-induced release of acidic amino acids in differentiating cerebellar granule cell cultures. *Brain Res.* 290 1984 (1) *Jan.* 2 77-86
- Levin et al., 1995 Levin, G.; Keren, T.; Peretz, T.; Chikvashvili, D.; Thornhill, W.B. und Lotan, I. Regulation of RCK1 currents with a cAMP analog via enhanced protein synthesis and direct channel phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270 1995 (24) *Jun.* 16 14611-8
- Levison und Goldman, 1993 Levison, S.W. und Goldman, J.E. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10 1993 (2) *Feb.* 201-12
- Levison und Goldman, 1997 Levison, S.W. und Goldman, J.E. Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. *J. Neurosci. Res.* 48 1997 (2) *Apr.* 15 83-94
- Levitan, 1985 Levitan, I.B. Phosphorylation of ion channels. *J. Membr. Biol.* 87 1985 (3) 177-90
- Levitan, 1994 Levitan, I.B. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu. Rev. Physiol.* 56 1994 193-212
- Liman et al., 1992 Liman, E.R.; Tytgat, J. und Hess, P. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9 1992 (5) *Nov.* 861-71
- Löffler und Hunter, 1997 Löffler, K. und Hunter, M. Cation permeation and blockade of ROMK1, a cloned renal potassium channel. *Pflügers Arch.* 434 1997 (2) *Jun.* 151-8
- Lohr und Yohe, 1994 Lohr, J.W. und Yohe, L.A. Mechanisms of hypoosmotic volume regulation in glioma cells. *Brain Res.* 667 1994 (2) *Dec* 26 263-8

- Ludwin, 1997 Ludwin, S.K. The pathobiology of the oligodendrocyte. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56 1997 (2) Feb. 111-124
- McKinnon et al., 1990 McKinnon, R.D.; Matsui, T.; Dubois-Dalcq, M. und Aaronson, S.A. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5 1990 603-614
- McKinnon und Yellen, 1990 McKinnon, R. und Yellen, G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science Wash. DC* 250 1990 276-279
- McKinnon und Miller, 1989 McKinnon, R. und Miller, C. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science Wash. DC* 245 1989 1382-85
- McLarnon und Kim, 1989 McLarnon, J.G. und Kim, S.U. Single channel potassium currents in cultured adult bovine oligodendrocytes. *Glia* 2 1989 (5) 298-307
- McMorris und McKinnon, 1996 McMorris, F.A. und McKinnon, R.D. Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: Prospects for therapy of demyelinating disease. *Brain Pathol.* 6 1996 313-29
- Mi et al., 1995 Mi, H.; Deerinck, T.J.; Ellisman, M.H. und Schwarz, T.L. Differential distribution of closely related potassium channels in rat Schwann cells. *J. Neurosci.* 15 1995 (5 Pt 2) May 3761-74
- Miller, 1996 Miller, R.H. Oligodendrocyte origins. *TINS* 19 1996 (3) 92-96
- Morell et al., 1990 Morell, P.; Roberson, M.D.; Meissner, G. und Toews, A.D. Myelin: from electrical insulator to ion channels. *Prog. Clin. Biol. Res.* 336 1990 1-23
- Moran et al., 1992 Moran, O., Schreibmayer, W., Weigl, L., Dascal, N. and Lotan, I. Level of expression controls mode of gating of a K⁺ channel. *FEBS* 302 1992 (1) 21-25
- Morrissey et al., 1995 Morrissey, T.K.; Levi, A.D.; Nuijens, A.; Sliwkowski, M.X. und Bunge, R.P. Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 1995 (5) Feb. 28 1431-5
- Müller et al., 1994 Müller, T.; Fritschy, J.M.; Grosche, J.; Pratt, G.D.; Mohler, H. und Kettenmann, H. Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* 14 1994 (5 Pt 1) May 2503-14
- Müller et al., 1992 Müller, T.; Möller, T.; Berger, T.; Schnitzer, J. und Kettenmann, H. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256 1992 (5063) Jun. 12 1563-6
- Nakahira et al., 1996 Nakahira, K.; Shi, G.; Rhodes, K.J. und Trimmer, J.S. Selective interaction of voltage-gated K⁺ channel β -subunits with α -subunits. *J. Biol. Chem.* 271 1996 (12) Mar. 22 7084-9
- Neher und Sakmann, 1976 Neher, E. und Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260 1976 (5554) Apr 29 799-802
- Noble et al., 1988 Noble, M.; Murray, K.; Stroobant, P.; Waterfield, M.D. und Riddle, P. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333 1988 (6173) Jun. 9 560-62
- Noble et al., 1990 Noble, Barnett, S.C.; Bogler, O.; Land, H.; Wolswijk, G. und Wren, D. Control of division and differentiation in oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells. *Ciba-Found-Symp.* 150 1990 227-43
- Noble und Wolswijk, 1992 Noble, M. und Wolswijk, G. Development and regeneration in the O-2A lineage: studies in vitro and in vivo. *J. Neuroimmunol.* 40 1992 (2-3) Oct. 287-93
- Pak et al., 1991 Pak, M.D.; Covarrubias, M.; Ratcliffe, A. und Salkoff, L. A mouse brain homolog of the *Drosophila* Shab K⁺ channel with conserved delayed-rectifier properties. *J. Neurosci.* 11 1991 (3) Mar. 869-80

- Papazian et al., 1987 Papazian, D.M.; Schwarz, T.L.; Tempel, B.L.; Jan, Y.N. und Jan, L.Y. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237 1987 (4816) Aug. 14 749-53
- Papazian et al., 1991 Papazian, D.M.; Timpe, L.C.; Jan, Y.N. und Jan, L.Y. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349 1991 (6307) Jan. 24 305-10
- Pastor et al., 1995 Pastor, A.; Chvatal, A.; Sykova, E. und Kettenmann, H. Glycine- and GABA-activated currents in glial cells of the developing rat spinal cord slice. *Eur. J. Neurosci.* 7 1995 (6) Jun. 1 1188-98
- Patneau et al., 1994 Patneau, D.K.; Wright, P.W.; Winters, C.; Mayer, M.L. und Gallo, V. Glial cells of the oligodendrocyte lineage express both kainate- and AMPA-preferring subtypes of glutamate receptor. *J. Neurosci.* 12 1994 357-371
- Pongs, 1992 Pongs, O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev.* 72 1992 (4 Suppl) Oct. S69-88
- Raff et al., 1978 Raff, M.C.; Mirsky, R.; Fields, K.L.; Lisak, R.P.; Dorfman, S.H.; Silberberg, D.H.; Gregson, N.A.; Leibowitz, S. und Kennedy, M.C. Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature* 274 1978 (5673) Aug. 24 813-6
- Raff et al., 1983 Raff, M.C.; Miller, R.H. und Noble, M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303 1983 (5916), Jun. 2-8 390-6
- Raff et al., 1988 Raff, M.C.; Lillien, L.E.; Richardson, W.D.; Burne, J.F. und Noble, M.D. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 333 1988 (6173) Jun. 9 562-5
- Raff et al., 1993 Raff, M.C.; Barres, B.A.; Burne, J.F.; Coles, H.S.; Ishizaki, Y. und Jacobson, M.D. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262 1993 Oct. 29 695-700
- Ranscht et al., 1982 Ranscht, B.; Clapshaw, P.A.; Price, J.; Noble, M. und Seifert, W. Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 1982 (8) Apr. 2709-13
- Rettig et al., 1992 Rettig, J.; Wunder, F.; Stocker, M.; Lichtinghagen, R.; Mastiaux, F.; Beckh, S.; Kues, W.; Pedarzani, P.; Schroter, K.H.; Ruppertsberg, J.P.; et al. Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain. *EMBO J.* 11 1992 (7) Jul. 2473-86
- Rettig et al., 1994 Rettig, J.; Heinemann, S.H.; Wunder, F.; Lorra, C.; Parcej, D.N.; Dolly, J.O. und Pongs, O. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* 369 1994 (6478) May 26 289-94
- Reuter, 1996 Reuter, H. Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6 1996 (3) Jun. 331-7
- Roach et al., 1985 Roach, A.; Takahashi, N.; Pravtcheva, D.; Ruddle, F. und Hood, L. Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. *Cell* 42 1985 (1) Aug. 149-55
- Robert und Magistretti, 1997 Robert, A. und Magistretti, P.J. AMPA/kainate receptor activation blocks K⁺ currents via internal Na⁺ increase in mouse cultured stellate astrocytes. *Glia* 20 1997 38-50
- Roeper et al., 1998 Roeper, J.; Sewing, S.; Zhang, Y.; Sommer, T.; Wanner, S.G. und Pongs, O. NIP domain prevents N-type inactivation in voltage-gated potassium channels. *Nature* 391 1998 Jan. 390-393
- Rosenbluth, 1980 Rosenbluth, J. Central myelin in the mouse mutant shiverer. *J. Comp. Neurol.* 194 1980 (3) Dec. 1 639-48
- Rosner et al., 1985 Rosner, H.; Al-Aqtum, M. und Henke-Fahle, S. Developmental expression of GD3

- and polysialogangliosides in embryonic chicken nervous tissue reacting with monoclonal anti-ganglioside antibodies. *Dev. Brain Res.* 18 1985 85-95
- Roy et al., 1996 Roy, M.L.; Saal, D.; Perney, T.; Sontheimer, H.; Waxman, S.G. und Kaczmarek, L.K. Manipulation of the delayed rectifier Kv1.5 potassium channel in glial cells by antisense oligodeoxynucleotides. *Glia* 18 1996 (3) Nov. 177-84
- Rudy et al., 1988 Rudy, B.; Hoyer, J.H.; Lester, H.A. und Davidson, N. At least two mRNA species contribute to the properties of rat brain A-type potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 1 1988 (8) Oct. 649-58
- Ruppersberg et al., 1990 Ruppersberg, J.P.; Schröter, K.H.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Sewing, S. und Pongs, O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 345 1990 535-537
- Ruppersberg et al., 1991 Ruppersberg, J.P.; Stocker, M.; Pongs, O.; Heinemann, S.H.; Frank, R. und Koenen, M. Regulation of fast inactivation of cloned mammalian IK(A) channels by cysteine oxidation. *Nature* 352 1991 (6337) Aug. 22 711-4
- Salinas et al., 1997 Salinas, M.; Duprat, F.; Heurteaux, C.; Hugnot, J.P. und Lazdunski, M. New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 272 1997 (39) Sep. 26 24371-9
- Scannevin et al., 1996 Scannevin, R.H., Murakoshi, H., Rhodes, K.J., und Trimmer, J.S. Identification of a cytoplasmic domain important in the polarized expression and clustering of the Kv2.1 K⁺ channel. *J. Cell Biol.* 135 1996 1619-1632
- Schneggenburger et al., 1993 Schneggenburger, R.; Zhou, Z.; Konnerth, A. und Neher, E. Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* 11 1993 (1) Jul. 133-43
- Schneider et al., 1995 Schneider, A.M.; Griffiths, I.R.; Readhead, C. und Nave, K.A. Dominant-negative action of the jimpy mutation in mice complemented with an autosomal transgene for myelin proteolipid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 1995 (10) May 9 4447-51
- Sewing et al., 1996 Sewing, S.; Roeper, J. und Pongs, O. Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* 16 1996 (2) Feb. 455-63
- Shahidullah et al., 1995 Shahidullah, M.; Hoshi, N.; Yokoyama, S. und Higashida, H. Microheterogeneity in heteromultimeric assemblies formed by Shaker (Kv1) and Shaw (Kv3) subfamilies of voltage-gated K⁺ channels. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 261 1995 (1362) Sep. 22 309-17
- Sheng et al., 1993 Sheng, M.; Liao, Y.J.; Jan, Y.N. und Jan, L.Y. Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected in vivo. *Nature* 365 1993 72-75
- Shermann-Gold, 1993 Sherman-Gold, R. Sherman-Gold, R. *Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques* 1993 Axon Instruments Inc. 1993
- Shi et al., 1996 Shi, G., Nakahira, K., Hammond, S., Rhodes, K.J., Schechter, L.E. und Trimmer, J.S. b- subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biogenesis. *Neuron* 16 1996 Apr. 843-852
- Small et al., 1987 Small, R.K.; Riddle, P. und Noble, M. Evidence for migration of oligodendrocyte--type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* 328 1987 (6126) Jul. 9-15 155-7
- Smart et al., 1997 Smart, S.L.; Bosma, M.M. und Tempel, B.L. Identification of the delayed rectifier potassium channel, Kv1.6, in cultured astrocytes. *Glia* 20 1997 (2) Jun. 127-34
- Soliven et al., 1989 Soliven, B.; Szuchet, S.; Arnason, B.G. und Nelson, D.J. Expression and modulation of K⁺ currents in oligodendrocytes: possible role in myelinogenesis. *Dev. Neurosci.* 11 1989 (2) 118-31
- Sommer und Schachner, 1981 Sommer, I. und Schachner, M. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: An immunocytochemical study in the central nervous system.

- Sontheimer und Waxman, 1993 Sontheimer, H. und Waxman, S.G. Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* 70 1993 (5) Nov. 1863-73
- Sontheimer, 1994 Sontheimer, H. Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* 11 1994 (2) Jun. 156-72
- Sontheimer et al., 1989 Sontheimer, H.; Trotter, J.; Schachner, M. und Kettenmann, H. Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron* 2 1989 (2) Feb. 1135-45
- Stewart et al., 1991 Stewart, H.J.; Eccleston, P.A.; Jessen, K.R. und Mirsky, R. Mitogenic response and phenotype of short- and long-term cultured Schwann cells. Relationship to intracellular cAMP levels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633 1991 537-9
- Storch und Lassmann, 1997 Storch, M und Lassmann, H. Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 10 1997 (3) Jun. 186-92
- Stühmer et al., 1989 Stühmer, W.; Ruppersberg, J.P.; Schroter, K.H.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Giese, K.P.; Perschke, A.; Baumann, A. und Pongs, O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.* 8 1989 (11) Nov. 3235-44
- Swanson et al., 1990 Swanson, R.; Marshall, J.; Smith, J.S.; Williams, J.B.; Boyle, M.B.; Folander, K.; Luneau, C.J.; Antanavage, J.; Oliva, C.; Buhrow, S.A.; et al. Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron* 4 1990 (6) Jun. 929-39
- Tempia et al., 1996 Tempia, F.; Kano, M.; Schneggenburger, R.; Schirra, C.; Garaschuk, O.; Plant, T. und Konnerth, A. Fractional calcium current through neuronal AMPA-receptor channels with a low calcium permeability. *J. Neurosci.* 16 1996 (2) Jan. 15 456-66
- Tempel et al., 1987 Tempel, B.L.; Papazian, D.M.; Schwarz, T.L.; Jan, Y.N. und Jan, L.Y. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237 1987 (4816) Aug. 14 770-5
- Temple und Raff, 1986 Temple, S. und Raff, M.C. Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* 44 1986 (5) Mar. 14 773-9
- Timpe et al., 1988 Timpe, L.C.; Schwarz, T.L.; Tempel, B.L.; Papazian, D.M.; Jan, Y.N. und Jan, L.Y. Expression of functional potassium channels from Shaker cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* 331 1988 (6152) Jan. 14 143-5
- Timpe und Fantl, 1994 Timpe, L.C. und Fantl, W.J. Modulation of a voltage-activated potassium channel by peptide growth factor receptors. *J. Neurosci.* 14 1994 (3 Pt 1) Mar. 1195-201
- Trojanowski et al., 1983 Trojanowski, J.Q.; Obrocka, M.A. und Lee, V.M.-Y. A comparison of eight different chromogen protocols for the demonstration of immunoreactive neurofilaments or glial filaments in rat cerebellum using the peroxidase- antiperoxidase method and monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 31 1983 (10) 1217-1223
- Trotter et al., 1989 Trotter, J.; Bitter-Suermann, D. und Schachner, M. Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin. *J. Neurosci. Res.* 22 1989 (4) Apr. 369-83
- Veh et al., 1995 Veh, R.W.; Lichtinghagen, R.; Sewing, S.; Wunder, F.; Grumbach, I.M. und Pongs, O. Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 7 1995 (11) Nov 1 2189-205
- Verkhatsky et al., 1991 Verkhatsky, A.; Hoppe, D. und Kettenmann, H. Single K⁺ channel properties in cultured mouse Schwann cells: conductance and kinetics. *J. Neurosci. Res.* 28 1991 (2)

- von Blankenfeld und Kettenmann, 1991 von Blankenfeld, G. und Kettenmann, H. Glutamate and GABA receptors in vertebrate glial cells. *Mol. Neurobiol.* 5 1991 (1) *Spring* 31-43
- Wang et al., 1994 Wang, H.; Kunkel, D.D.; Schwartzkroin, P.A. und Tempel, B.L. Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J. Neurosci.* 14 1994 (8) *Aug.* 4588-99
- Wang et al., 1993 Wang, H.; Kunkel, D.D.; Martin, T.M.; Schwartzkroin, P.A. und Tempel, B.L. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365 1993 (6441) *Sep.* 2 75-9
- Wang et al., 1992 Wang, S.Y.; Castle, N.A. und Wang, G.K. Identification of RBK1 potassium channels in C6 astrocytoma cells. *Glia* 5 1992 (2) 146-53
- Warf et al., 1991 Warf, B.C.; Fok-Seang, J. und Miller, R.H. Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 11 1991 (8) *Aug.* 2477-88
- Warner et al., 1996 Warner, L.E.; Roa, B.B. und Lupski, J.R. Absence of PMP22 coding region mutations in CMT1A duplication patients: further evidence supporting gene dosage as a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum-Mutat.* 8 1996 (4) 362-5
- Waxman und Ritchie, 1985 Waxman, S.G. und Ritchie, J.M. Organization of ion channels in the myelinated nerve fiber. *Science* 228 1985 (4707) *Jun.* 28 1502-7
- Waxman und Ritchie, 1993 Waxman, S.G. und Ritchie, J.M. Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann. Neurol.* 33 1993 (2) *Feb.* 121-36
- Wei, 1996 Wei, A.; Jegla, T. und Salkoff, L. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* 35 1996 (7) 805-29
- Wilkin et al., 1976 Wilkin, G.P.; Balazs, R.; Wilson, J.E.; Cohen, J. und Dutton, G.R. Preparation of cell bodies from the developing cerebellum: structural and metabolic integrity of the isolated cells. *Brain Res.* 115 1976 181-199
- Wymore et al., 1994 Wymore, R.S.; Korenberg, J.R.; Kinoshita, K.D.; Aiyar, J.; Coyne, C.; Chen, X.N.; Hustad, C.M.; Copeland, N.G.; Gutman, G.A.; Jenkins, N.A.; et al. Genomic organization, nucleotide sequence, biophysical properties, and localization of the voltage-gated K⁺ channel gene KCNA4/Kv1.4 to mouse chromosome 2/human 11p14 and mapping of KCNC1/Kv3.1 to mouse 7/human 11p14.3-p15.2 and KCNA1/Kv1.1 to human 12p13. *Genomics* 20 1994 (2) *Mar.* 15 191-202
- Wymore et al., 1996 Wymore, R.S.; Negulescu, D.; Kinoshita, K.; Kalman, K.; Aiyar, J.; Gutman, G.A. und Chandy, K.G. Characterization of the transcription unit of mouse Kv1.4, a voltage-gated potassium channel gene. *J. Biol. Chem.* 271 1996 (26) *Jun.* 28 15629-34
- Xu und Rozanski, 1997 Xu, Z. und Rozanski, G.J. Proton inhibition of transient outward potassium current in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29 1997 (2) *Feb.* 481-90
- Yu et al., 1997 Yu, S.P.; Yeh, C.-H.; Sensi, S.L.; Gwag, B.J.; Canzoniero, L.M.T.; Farhangrazi, Z.S., Ying, H.S.; Tian, M.; Dugan, L.L. und Choi, D.W. Mediation of Neuronal Apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278 1997 *Oct.* 3 114-7
- Yu et al., 1994 Yu, W.P.; Collarini, E.J.; Pringle, N.P. und Richardson, W.D. Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* 12 1994 (6) *Jun.* 1353-62
- Zucker, 1993 Zucker, R.S. Calcium and transmitter release. *J. Physiol. Paris* 87 1993 (1) 25-36

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Oligodendrozyten bilden die Myelinscheide von Axonen	4
Abbildung 2 Schema der Oligodendrozytenentwicklung	5
Abbildung 3 Am Ionentransport von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen beteiligte Membranproteine	6
Abbildung 4 Molekularer Aufbau von spannungsabhängigen Kaliumkanälen	8
Abbildung 5 Patch-Clamp-Konfigurationen nach Hamill et al., 1981.	17
Abbildung 6 Aufbau eines elektrophysiologischen Meßplatzes.	18
Abbildung 7 Spannungssprungsprotokolle zur elektrophysiologischen Charakterisierung von Membranströmen mit der Patch-Clamp-Technik	20
Abbildung 8 Prinzip der immunzytochemischen Analyse mit der Avidin-Biotin-Technik.	22
Abbildung 9 Immunzytochemische Charakterisierung der Kultur anhand stadienspezifischer Antigene	27
Abbildung 10 Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung von kultivierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Maus	30
Abbildung 11 Block der K^+ Auswärtsströme durch Tetraethylammonium (TEA)	32
Abbildung 12 Block der Auswärtsströme von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen durch 4-Aminopyridin (4-AP)	33
Abbildung 13 Geringe Konzentrationen von TEA und 4-AP hemmen eine Teilkomponente des Stromes	35
Abbildung 14 Blockierbarkeit der K^+ Ströme durch α -Dendrotoxin (DTX), Charybdotoxin (CTX) und MCDP (mast cell degranulating peptide)	36
Abbildung 15 Block der Auswärtsströme von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen durch Chinidin	38
Abbildung 16 Expression der Kv1 Kaliumkanalmoleküle in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Maus	39
Abbildung 17 Lokalisation von Kv1.1 und Kv1.4 K^+ Kanalmolekülen auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	40
Abbildung 18 Lokalisation von Kv1.5 und Kv1.6 K^+ Kanalmolekülen auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	42
Abbildung 19 Keine Expression von Kv1.2 und Kv1.3 Proteinen auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	43
Abbildung 20 Analyse der Kv1-Transkriptexpression mit Hilfe der Einzelzell-PCR-Technik	45
Abbildung 21 Kv1 Transkriptexpression und Ganzzellstrommuster von einzelnen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	46
Abbildung 22 Elektrophysiologische Eigenschaften von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Vergleich zur Expression des Kv1.1-Proteins	48
Abbildung 23 Elektrophysiologische Eigenschaften von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Vergleich zur Expression des Kv1.4-Proteins	50
Abbildung 24 Kultivierte Körnerzellen reagieren auf die Applikation von GABA (10^{-4} M) mit der Aktivierung eines Auswärtswärtsstromes von Cl^- Ionen.	52
Abbildung 25 Der GABA _A -Rezeptor-Agonist Muscimol reproduziert die durch GABA hervorgerufenen Effekte an kultivierten Körnerzellen	53
Abbildung 26 Die GABA-Antwort bei kultivierten Körnerzellen besteht aus zwei Komponenten.	55
Abbildung 27 Effekt von GABA auf den "delayed rectifier-" und den "A-Typ-" Strom bei Körnerzellen	56
Abbildung 28 GABA blockiert auswärts rektifizierende K^+ Kanäle in der "cell-attached-" Konfiguration	57
Abbildung 29	59

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Arten von spannungsabhängigen Kaliumkanalmolekülen</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 2 Anteile von Kv1 Transkripten in einzelnen Oligodendrozytenvorläuferzellen</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 3 Blockierbarkeit von homomeren Kv1 Kanälen durch spezifische K⁺ Kanalblocker</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 4 Häufigkeit der Expression von Kv1 Transkripten bzw. Proteinen</i>	<i>67</i>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Bedanken möchte ich mich bei Priv. Doz. Dr. H.Kettenmann für die Bereitstellung des interessanten Themas und der sehr guten Arbeitsbedingungen sowie bei Dr. F.Kirchhoff für die Betreuung der Arbeit, seine Anregungen beim Schreiben des Manuskripts und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei allen Problemen. Ebenfalls möchte ich mich bei ihm für die Zusammenarbeit bei den Einzelzell-PCR-Untersuchungen bedanken.

Für die sehr gute technische Unterstützung danke ich Brigitte Hunger für die Arbeiten in der Zellkultur, Regina Krauss für diverse Labor- und Fotoarbeiten, Sybille Just für die PCR-Experimente und Horst Kagelmaker für die Unterstützung bei technischen und mechanischen Arbeiten.

Die immunozytochemischen Untersuchungen der Shaker-Kaliumkanalproteine wurden in Zusammenarbeit mit Dirk Eulitz und Rüdiger Veh vom Institut für Anatomie der Charité Berlin durchgeführt. Ihnen danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft sowie für die Bereitstellung einiger Antikörper.

Danken möchte ich auch Priv. Doz. Dr. I.Bernhardt für die bereitwillige Übernahme des Koreferats und das Lesen des Manuskripts.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Zelluläre Neurobiologie" des MDC Berlin für die kooperative und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Kathrin Schmidt
geb. 12.02.1970 in Berlin
ledig, keine Kinder

Schulausbildung

1976 - 1986 POS Berlin-Lichtenberg
1986 - 1988 EOS Strausberg

Studium

WS 1989 - SS 1994 Biophysik
 Humboldt-Universität zu Berlin
SS 1993 Studienjahresarbeit: "Patch-clamp-Untersuchungen an Cl⁻
 Kanälen von *Chenopodium album* Protoplasten"
 Note: "sehr gut"
Sep. 1993 - Jun. 1994 Diplomarbeit: "Einzelkanaluntersuchungen zur Charakterisierung
 eines Na⁺- sensitiven K⁺ Kanals an kultivierten Vorläuferzellen
 der Maus"
 Note: "sehr gut"

Berufspraxis

Sept. 1988 - Jul. 1989 Laborpraktikum
 Institut für medizinische Physik und Biophysik der Charité Berlin

seit Jan. 1996 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
 MDC Berlin, FG "Zelluläre Neurobiologie"
 Thema der Promotion: "Elektrophysiologische und
 molekularbiologische Untersuchungen an spannungsabhängigen
 K⁺ Kanälen auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Maus"

Nebentätigkeiten

SS 1991 - WS 1993 Tutorentätigkeit (Betreuung des Physikpraktikums)
 Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität (Charité Berlin)

Weiterbildung

seit Sept. 1995 Zusatzstudium Medizinphysik
Jul.- Aug. 1997 Intensivkurs Englisch
 Hilderstone College Broadstairs/ Kent

Berlin, den 26.03.1998

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Verfahren, Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, 20.12.1998

Kathrin Schmidt